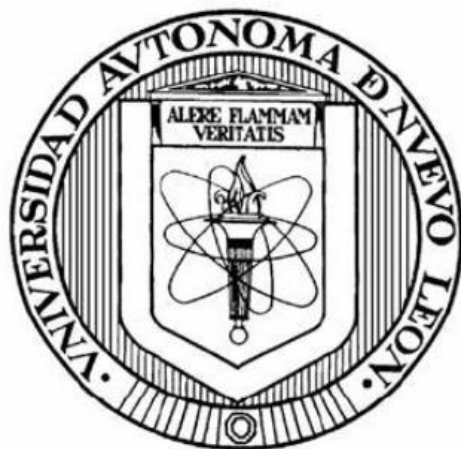


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LOS GENES *esxG* y *esxH* EN LA RESISTENCIA A  
FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA EN *Mycobacterium smegmatis* COMO MODELO  
DE *M. tuberculosis***

**POR**

**ANA LAURA GRANADOS TRISTÁN**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**DICIEMBRE, 2018**

EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LOS GENES *esxG* y *esxH* EN LA RESISTENCIA  
A FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA EN *Mycobacterium smegmatis* COMO  
MODELO DE *M. tuberculosis*  
Comité de Tesis

---

Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna  
Presidente

---

Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal  
Secretario

---

Dra. Licet Villarreal Treviño  
Vocal

---

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero  
Vocal

---

Dra. Katia Peñuelas Urquides  
Vocal

EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LOS GENES *esxG* y *esxH* EN LA RESISTENCIA  
A FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA EN *Mycobacterium smegmatis* COMO  
MODELO DE *M. tuberculosis*

Dirección de Tesis

---

Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna  
Director interno

---

Dra. Katia Peñuelas Urquides  
Director externo

EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LOS GENES *esxG* y *esxH* EN LA RESISTENCIA  
A FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA EN *Mycobacterium smegmatis* COMO  
MODELO DE *M. tuberculosis*

Por

Ana Laura Granados Tristán

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Enzimología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección del Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna, y en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social bajo la dirección de la Dra. Katia Peñuelas Urquides.

---

Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna  
Director interno

---

Dra. Katia Peñuelas Urquides  
Director externo

## AGRADECIMIENTOS

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios de Maestría otorgándome la beca con numero 462073 y número de registro 618721.

Gracias a la Subdirección de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL por la formación académica y a todos los catedráticos por orientarme e impulsarme en la ciencia.

Gracias al Laboratorio de Enzimología de la Facultad de Ciencias Biológicas y al Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS por permitir el desarrollo de esta investigación, bajo el proyecto “Relación de la expresión de los genes *esxG* y *esxH* con la farmacorresistencia de *Mycobacterium tuberculosis*” con número R-2015-1906-6 FIS/IMSS/PROT/G15/1457; y al IMSS por el apoyo económico complementario con número de matrícula 97205588.

Gracias a la Dra. Katia Peñuelas por su orientación en este camino, su paciencia, dedicación, motivación, criterio y su impulso para mi crecimiento profesional y personal; así como por compartir todos esos conocimientos y el apoyo en cada paso.

Gracias al Dr. Carlos Hernández Luna por sus valiosos consejos, apoyo, orientación y compromiso para la realización del presente proyecto.

Gracias al Dr. Mario Bermúdez por su asesoramiento, consejo, apoyo, orientación, compromiso y paciencia, para compartir sus conocimientos y experiencias, impulsando mi crecimiento profesional y personal.

Gracias a la Dra. Aréchiga, a la Dra Villareal y al Dr. Contreras por ser parte del comité de tesis, por su tiempo, compromiso, consejos y conocimientos para poder realizar el proyecto.

Gracias a todos mis compañeros del laboratorio por sus consejos, enseñanzas, ánimos y por compartir sus experiencias.

Gracias a mis padres Fernando y Laura, a mis hermanas y a mi familia por estar apoyándome en este camino.

Gracias a todas las personas que estuvieron conmigo durante la realización de este proyecto.

## DEDICATORIA

A mi familia

Por todo el apoyo incondicional,  
por creer en mí e impulsarme a lograr  
todos mis éxitos.

A la ciencia

*Es el camino hacia la verdad.  
Porque la ciencia propone, pero la biología dispone.*

*La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones  
y la fuente de vida de todo progreso.*

Louis Pasteur.

# ÍNDICE

| SECCION   | PAGINA |
|---|--------|
| ÍNDICE .....  | VI     |
| ÍNDICE DE TABLAS .....  | IX     |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....  | X      |
| LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS .....                                    | XII    |
| RESUMEN.....  | XV     |
| ABSTRACT.....   | XVI    |
| 1. INTRODUCCIÓN .....   | 1      |
| 2. ANTECEDENTES.....  | 3      |
| 2.1. Tuberculosis .....   | 3      |
| 2.2. Epidemiología .....  | 3      |
| 2.3. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....                              | 4      |
| 2.4. Tratamiento de la Tuberculosis.....                                  | 5      |
| 2.5. Resistencia a fármacos de <i>M. tuberculosis</i> .....               | 6      |
| 2.6. Características de los genes <i>esxG</i> y <i>esxH</i> .....         | 10     |
| 2.6.1. Sistema de secreción ESAT-6.....                                   | 10     |
| 2.6.2. Características de <i>esxG</i> y <i>esxH</i> .....                 | 11     |
| 2.7. Estrategias para el estudio de genes de <i>M. tuberculosis</i> ..... | 13     |
| 2.7.1. Características de <i>Mycobacterium smegmatis</i> .....            | 15     |
| 3. JUSTIFICACIÓN .....  | 17     |
| 4. HIPÓTESIS.....   | 18     |
| 5. OBJETIVOS .....  | 19     |
| 5.1. OBJETIVO GENERAL.....  | 19     |

| SECCION  | PAGINA |
|--|--------|
| 5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....  | 19     |
| 6. MATERIAL Y MÉTODOS.....   | 20     |
| 6.1. Cultivo de la cepa de <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 modelo de <i>M. tuberculosis</i> .....  | 20     |
| 6.2 Inhibición de los genes <i>esxG</i> ( <i>Msmeg_0620</i> ) y <i>esxH</i> ( <i>Msmeg_0621</i> ) en <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 por medio del RNA antisentido.....                          | 20     |
| 6.2.1 Amplificación y verificación de los genes <i>esxG</i> ( <i>Msmeg_0620</i> ) y <i>esxH</i> ( <i>Msmeg_0621</i> ).....   | 20     |
| 6.2.2 Clonación de los genes <i>esxG</i> ( <i>Msmeg_0620</i> ) y <i>esxH</i> ( <i>Msmeg_0621</i> ). .....  | 23     |
| 6.2.3 Transformación de <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 con la construcción pMV261- <i>esxG/H</i> antisentido. ....  | 26     |
| 6.3 Evaluación de la inhibición de los genes <i>esxG</i> ( <i>Msmeg_0620</i> ) y <i>esxH</i> ( <i>Msmeg_0621</i> ) en <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155. ....                                      | 27     |
| 6.4 Evaluación del efecto de fármacos de primera línea en las cepas mutadas. ....  | 28     |
| 7. RESULTADOS.....   | 30     |
| 7.1. Inhibición de los genes <i>esxG</i> ( <i>Msmeg_0620</i> ) y <i>esxH</i> ( <i>Msmeg_0621</i> ) en <i>M. smegmatis</i> utilizando un RNA antisentido.....   | 30     |
| 7.3. Evaluación de la inhibición de los genes <i>esxG</i> ( <i>Msmeg_0620</i> ) y <i>esxH</i> ( <i>Msmeg_0621</i> ).....   | 36     |
| 7.4. Evaluación del efecto de la inhibición de los genes <i>esxG</i> ( <i>Msmeg_0620</i> ) y <i>esxH</i> ( <i>Msmeg_0621</i> ) de <i>M. smegmatis</i> en la resistencia a fármacos de primera línea..... | 38     |
| 8. DISCUSIÓN .....   | 43     |
| 9. CONCLUSIÓN.....   | 47     |
| 10. PERSPECTIVAS .....   | 48     |
| 11. ANEXO 1. Inhibición de los genes <i>esxG</i> ( <i>Msmeg_0620</i> ) y <i>esxH</i> ( <i>Msmeg_0621</i> ) en <i>M. smegmatis</i> utilizando el método de CRISPRi. ....                                  | 49     |



| SECCION                       | PAGINA |
|-------------------------------|--------|
| 11.1 Anexo1. Metodología..... | 49     |
| 11. Anexo 1. Resultados. .... | 50     |
| 11. BIBLIOGRAFIA .....        | 55     |
| RESUMEN BIOGRÁFICO .....      | 65     |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |     |
|---|-----|
| Tabla 1. Clasificación de fármacos contra la Tuberculosis (OMS,2018) .....  | 5   |
| Tabla 2. Genes marcadores de resistencia a fármacos (Almeida & Palomino, 2011). .....   | 8   |
| Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este estudio. ....  | 21  |
| Tabla 4. Cálculos para la reacción de amplificación de los genes <i>esxG</i> ( <i>Msmeg_0620</i> ), <i>esxH</i> ( <i>Msmeg_0621</i> ) y <i>sigA</i> de <i>M. smegmatis</i> . .... | 21  |
| Tabla 5. Condiciones de amplificación de los genes <i>esxG/esxH</i> ( <i>Msmeg0620</i> ) <i>l</i> ( <i>Msmeg_0621</i> ) y <i>sigA</i> . ....                                      | 22} |
| Tabla 6. Reacción de marcaje para secuenciación .....   | 22  |
| Tabla 7. Condiciones de la reacción de marcaje para secuenciación. ....   | 22  |
| Tabla 8. Concentraciones de fármacos de primera línea (Arriaga-Guerrero, 2016). ....  | 28  |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Resultados de la expresión diferencial de los genes <i>esxG</i> y <i>esxH</i> entre una cepa sensible y una multifarmacorresistente de <i>M. tuberculosis</i> . ....    | 9  |
| Figura 2. Representación esquemática del sistema de secreción Esx-3. ....   | 12 |
| Figura 3. Estrategia para identificar la orientación de los genes <i>esxG-esxH</i> en la construcción de pMV261. ....   | 25 |
| Figura 4. Amplificación por PCR de la región codificante de los genes <i>esxG</i> ( <i>Msmeg_0620</i> ) y <i>esxH</i> ( <i>Msmeg_0621</i> ) de <i>M. smegmatis</i> . ....         | 30 |
| Figura 5. Validación del fragmento amplificado de los genes <i>esxG</i> ( <i>Msmeg_0620</i> ), <i>esxH</i> ( <i>Msmeg_0621</i> ) y <i>sigA</i> por secuenciación. ....            | 31 |
| Figura 6. Amplificación de los genes <i>esxG-esxH</i> ( <i>Msmeg_0620-Msmeg_0621</i> ) de los candidatos de las construcciones en el vector de tránsito. ....                     | 32 |
| Figura 7. Amplificación de los genes <i>esxG-esxH</i> ( <i>Msmeg_0620-Msmeg_0621</i> ) del candidato de la construcción pMV261- <i>esxG-esxH</i> ( <i>Msmeg_0620-0621</i> ). .... | 33 |
| Figura 8. PCR para identificar el sentido de los genes <i>esxG-esxH</i> ( <i>Msmeg_0620-0621</i> ) en el vector pMV261. ....  | 34 |
| Figura 9. Confirmación de la presencia de la construcción pMV261- <i>esxG-esxH</i> ( <i>Msmeg_0620-0621</i> ) en <i>M. smegmatis</i> . ....                                       | 35 |
| Figura 10. Evaluación de la inhibición de los genes <i>esxG</i> ( <i>Msmeg_0620</i> ) y <i>esxH</i> ( <i>Msmeg_0621</i> ) de <i>M. smegmatis</i> . ....                           | 37 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 11. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de rifampicina, isoniazida y etambutol en <i>M. smegmatis</i> mc2155..... | 38 |
| Figura 12. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de rifampicina.....   | 39 |
| Figura 13. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de isoniazida. ....   | 39 |
| Figura 14. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de etambutol. ....  | 40 |
| Figura 15. Curva de crecimiento de las cepas de <i>M. smegmatis</i> en kanamicina.....  | 41 |
| Figura 16. Curva de crecimiento de cepas de <i>M. smegmatis</i> en diferentes concentraciones de rifampicina.....               | 41 |
| Figura 17. Curva de crecimiento de las cepas de <i>M. smegmatis</i> en diferentes concentraciones de isoniazida. ....           | 42 |

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

|                        |   |
|------------------------|---|
| RNA                    | Ácido ribonucleico  |
| DNA                    | Ácido desoxirribonucleico                                 |
| cDNA                   | Ácido desoxirribonucleico complementario                  |
| rRNA                   | Ácido ribonucleico ribosomal                              |
| pb                     | Pares de bases  |
| Kpb                    | Kilo pares de bases (mil pares de bases)                  |
| mM                     | Milimolar   |
| c/u                    | Cada uno  |
| ng                     | Nanogramo   |
| μL                     | Microlitro  |
| μg                     | Microgramo  |
| μm                     | Micrómetro  |
| mL                     | Mililitro   |
| mm                     | Milímetro   |
| <i>M. tuberculosis</i> | <i>Mycobacterium tuberculosis</i>                         |
| TB                     | Tuberculosis  |
| CIBIN99                | Aislado clínico de <i>M. tuberculosis</i> CIBIN:UMF:15:99 |
| H37Rv                  | Cepa de referencia de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv        |
| <i>M. smegmatis</i>    | <i>Mycobacterium smegmatis</i>                            |
| MFR                    | Multifarmacorresistente                                   |

|                |  |
|----------------|--|
| XFR            | Tuberculosis con resistencia extendida                                     |
| BCG            | <i>Bacillus Calmette-Guérin</i>  |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i>  |
| CRISPR         | Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente interespaciadas |
| CRISPRi        | CRISPR de interferencia  |
| gRNA           | RNA guía   |
| nm             | Nanómetro  |
| U              | Unidades   |
| °C             | Grados centígrados   |
| rpm            | Revoluciones por minuto  |
| g              | Gravedades   |
| LB             | Medio Luria Bertani  |
| EDTA           | Ácido etilendiaminotetraacético  |
| INH            | Isoniazida   |
| RIF            | Rifampicina  |
| EMB            | Etambutol  |
| PZA            | Pirazinamida   |
| MPM            | Marcador de peso molecular   |
| MTBC           | Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>                                 |
| MNT            | Micobacterias no tuberculosas  |
| OMS            | Organización Mundial de la Salud   |

|                     |  |
|---------------------|--|
| SINAVE              | Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica                      |
| CENAPRECE           | Centro nacional de programas preventivos y control de enfermedades |
| PCR                 | Reacción en cadena de la polimerasa                                |
| DMSO                | Dimetilsulfóxido   |
| dNTP                | Desoxinucleótido trifosfato  |
| MgCl <sub>2</sub>   | Cloruro de Magnesio  |
| H <sub>2</sub> O NF | Agua libre de nucleasas  |
| VIH                 | Virus de la inmunodeficiencia humana                               |
| REMA                | Método de microdilución en placa con resazurina                    |
| CMI                 | Concentración mínima inhibitoria                                   |

## RESUMEN

La tuberculosis afecta a aproximadamente un tercio de la población mundial. En el año 2017 se reportaron 10 millones de casos y 1.3 millones de muertes. El tratamiento de esta enfermedad se lleva a cabo por 6 meses con los fármacos de primera línea isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol; sin embargo, su eficacia ha disminuido debido a la aparición de cepas resistentes. La resistencia a fármacos en *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causal de la enfermedad, se ha vinculado principalmente a mutaciones en genes específicos, pero esta relación no se cumple en todos los casos. En base a estos antecedentes nuestro grupo de trabajo realizó una comparación de la expresión genética entre una cepa sensible y una multifármacorresistente, en donde diversos genes mostraron una expresión diferencial. Dentro de estos genes se encuentran los genes *esxG* y *esxH*, los cuales mostraron un aumento en la expresión en la cepa de *M. tuberculosis* resistente a fármacos de primera línea. Los genes *esxG* y *esxH* forman parte del clúster Esx-3 que codifica para un sistema de excreción tipo VII; específicamente estos genes codifican para proteínas que son secretadas por este sistema. El objetivo del presente proyecto es evaluar la contribución de los genes *esxG* y *esxH* al fenotipo de farmacorresistencia en *M. tuberculosis*, inhibiendo estos genes en *M. smegmatis* como modelo experimental de *M. tuberculosis*. Se utilizó la tecnología del RNA antisentido para inhibir dichos genes en *M. smegmatis*, confirmando su inhibición mediante la cuantificación de la amplificación de dichos genes (utilizando el software ImageJ), a partir del cDNA obtenido de la extracción del RNA total de la cepa con los genes inhibidos, se observó una inhibición del 40% en comparación con la cepa control. El efecto de la inhibición de los genes en la resistencia a fármacos se evaluó utilizando el método de REMA. Se observó un aumento en la resistencia a isoniazida en la cepa de *M. smegmatis* con los genes inhibidos en comparación con la cepa control; mientras que en rifampicina y etambutol no se observaron cambios en el umbral de resistencia.



## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a contagious disease and the most common form is pulmonary tuberculosis. In 2017, 10 million people fell ill with TB and 1.3 million people died from this disease. Tuberculosis is mainly caused by *Mycobacterium tuberculosis*. TB disease is treated by the first-line drugs isoniazid, rifampicin, etambutol and pyrazinamide, however its efficacy has decreased due to the emergence of drug resistant strains. Drug resistance has been associated with mutations in sequences of specific genes, nonetheless there are other mechanism that have not been elucidated. In the search for these mechanisms, our group previously reported the transcriptome differences between the sensitive strain H37Rv and the multidrug resistant isolate CIBIN:UMF:15:99 of *Mycobacterium tuberculosis*, identifying differences in the expression of some genes; among them, *esxG* and *esxH* showed overexpression in the multidrug resistant isolate. These genes code for proteins that are secreted by the Esx-3 system. The aim of this study was to evaluate the contribution of *esxG* and *esxH* genes in drug resistance phenotype of *M. tuberculosis*, through suppressing gene expression of these genes in *M. smegmatis* as an experimental model of *M. tuberculosis*. In this study we developed an expression vector to produce antisense RNA to target the entire open reading frame of *esxG* and *esxH*. To test the attenuation of these genes we obtained the total RNA and convert it to cDNA, then we amplified the genes and the PCR product was quantified by using the ImageJ software. We show a 40% inhibition of the genes in the attenuated strain compared to the control strain. The attenuated strain was tested for drugs resistance to first line drugs using the REMA plate method. The attenuated strain showed more resistance to INH than control strain while resistance to RIF and EMB was not modified.

# 1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa, registrada como la primera causa de muerte por un agente infeccioso. Esta enfermedad se encuentra dentro de las metas prioritarias de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para ponerle fin, ya que en el 2017 fue una de las 10 principales causas de muerte en el mundo (OMS, 2018). El principal agente causal de la tuberculosis es *Mycobacterium tuberculosis*, organismo que pertenece al filo *Actinobacteria*, familia *Mycobacteriaceae*. Para el tratamiento de la TB existen fármacos denominados de primera línea, los cuales son: isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida; sin embargo, existen cepas de *M. tuberculosis* que han desarrollado resistencia a estos fármacos. Las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina e isoniazida se les denominan multifarmacorresistentes (MFR).

En el 2016, en todo el mundo se estimó que 490 mil personas desarrollaron tuberculosis multifarmacorresistente, y 190 mil personas murieron a causa de tuberculosis MFR (OMS, 2017). Esta resistencia presenta un gran problema en México, así como en el resto del mundo debido a la falta de estrategias para combatirla con un diagnóstico y/o tratamiento oportuno.

La resistencia a fármacos se ha asociado principalmente a mutaciones en genes específicos, sin embargo, los mecanismos moleculares de estas cepas resistentes a los fármacos aún no se encuentran completamente dilucidados. El conocer estos mecanismos sería beneficioso ya que podría tener una aplicación directa en el diagnóstico de tuberculosis ocasionada por cepas resistentes a fármacos, lo cual permitiría mejorar la implementación de un tratamiento oportuno y, por otro lado, identificar más blancos terapéuticos.

En la búsqueda de estos mecanismos, nuestro grupo de investigación realizó un análisis de la expresión génica entre una cepa sensible (H37Rv) y una resistente a fármacos de *M. tuberculosis*, en donde se identificaron diversos genes que están potencialmente asociados a la farmacorresistencia; entre ellos se encuentran los genes *esxG* y *esxH* (Peñuelas-

Urquides *et al.*, 2013). Estos genes forman parte de un clúster que codifica para proteínas que forman parte del sistema de excreción Esx-3 y codifican para proteínas que son secretadas por este sistema.

El objetivo principal de este trabajo de investigación es conocer la contribución de los genes *esxG* y *esxH* al fenotipo de fármacorresistencia en *M. tuberculosis*, mediante la inhibición de estos genes en un modelo de *M. tuberculosis*.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Tuberculosis**

La TB es una enfermedad infecciosa, en la mayoría de los casos afecta a los pulmones sin embargo puede afectar otras zonas como el cerebro, huesos, laringe y nodo linfático, produciendo un daño tisular progresivo en estas zonas afectadas (Peto *et al*, 2009). La TB pulmonar se caracteriza principalmente por presentar tos crónica, fiebre en picos, sudoración nocturna, decaimiento, anorexia, pérdida de peso, y sin un tratamiento oportuno puede ocasionar la muerte (OMS, 2013b).

Su transmisión es por vía aérea, sucede cuando una persona con la enfermedad de tuberculosis pulmonar tose, estornuda o escupe, expulsando bacterias tuberculosas al aire. Basta con unas pocas bacterias (2-5 bacterias) para que la persona se infecte (Nahid *et al*, 2016). Una vez que se ha llevado a cabo la infección, esta enfermedad se puede presentar en forma activa o latente. En la forma activa de la enfermedad se presentan los síntomas mencionados, y pueden contagiar a otras personas, esto es debido a que el sistema inmune no puede combatir a la bacteria. La forma latente se define como un estado de respuesta inmunitaria persistente a antígenos de *M. tuberculosis* adquiridos con anterioridad que no se acompaña de manifestaciones clínicas ni se contagia a las demás personas, ya que las células bacterianas se encuentran en unas estructuras dinámicas denominadas granulomas (Mullie *et al*, 2017).

### **2.2. Epidemiología**

De acuerdo con la OMS, en el 2017 la TB fue una de las 10 principales causas de muerte en el mundo, además se reportaron 10 millones de nuevos casos y 1.3 millones de muertes en el mundo a causa de esta enfermedad (OMS, 2018). En México, en el 2016, se registraron 16,913 casos de TB y 2.4 mil muertes debido a esta enfermedad (CENAPRECE, 2017). Específicamente en Nuevo León, ese mismo año se reportaron 1,261 casos de TB, lo que lo situó dentro de los tres primeros lugares en incidencia después de Veracruz y Baja California (SINAVE, 2013).

### 2.3. *Mycobacterium tuberculosis*

El principal agente causal de la TB es la bacteria *M. tuberculosis*, la cual es un patógeno intracelular, perteneciente al filo *Actinobacter*, familia *Mycobacteriaceae*, género *Mycobacterium* (Shinnick & Good, 1994). Este microorganismo es miembro del Complejo *M. tuberculosis* (MTBC), los cuales son agentes causales de la TB, son patógenos intracelulares estrictos que infectan diferentes animales incluyendo al humano (Jagielski *et al*, 2016).

Dentro de las principales características de *M. tuberculosis* es que es un bacilo delgado de extremidades redondeadas, con longitud de 2-5  $\mu\text{m}$  y diámetro de 0.2 a 0.3  $\mu\text{m}$ , es aerobio obligado inmóvil puede sobrevivir con pocas cantidades de oxígeno, carece de capa o espora, no presenta ramificaciones, presenta características de ácido-alcohol resistencia; su crecimiento es lento con un tiempo de duplicación de 15-20 h y forma colonias no pigmentadas (Fenton & Vermeulen, 1996).

Además, *M. tuberculosis* tiene una pared celular compleja, la cual consta de una membrana interna seguida de una capa rígida de peptidoglicano asociada a diferentes proteínas que también están asociadas con la membrana interna; hacia el exterior el peptidoglicano está unido covalentemente mediante enlaces fosfodiéster con arabinogalactanos, los cuales están ligados de su porción distal con los ácidos micólicos. Este complejo de peptidoglicanos, arabinoglicanos y ácidos micólicos están asociados con el esqueleto de la pared celular (Brennan & Crick, 2007). Esta capa de ácidos micólicos, entre la cápsula (la última capa) y el peptidoglicano, es una segunda barrera hidrofóbica y se ha denominado “micomembrana” (Hoffmann *et al.*, 2008), la cual es similar a la de las bacterias Gram negativas. Esta característica de la micobacteria implica que necesita un sistema complejo para secretar las moléculas que le permiten sobrevivir, multiplicarse y proporcionarle resistencia a fármacos y detergentes (Abdallah *et al.*, 2007).

La principal estrategia para combatir la TB es utilizar fármacos en contra de la bacteria *M. tuberculosis*; es así como a nivel mundial se han desarrollado esquemas de tratamiento.

## 2.4. Tratamiento de la Tuberculosis

El principal esquema utilizado para el tratamiento de la TB se compone de fármacos de primera línea, los cuales representan al grupo 1 en la clasificación de la OMS (Tabla 1). Estos fármacos de primera línea son: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (EMB) y pirazinamida (PZA) (OMS, 2018). Este esquema principal de tratamiento dura 6 meses, o veinticinco semanas hasta administrar ciento cinco dosis, se divide en dos etapas: a) fase intensiva, sesenta dosis en un esquema de administración diaria sesenta dosis diarias de RIF, INH, PZA y EMB; y b) fase de sostén, cuarenta y cinco dosis en un esquema intermitente de tres veces a la semana de INH y RIF (NOM-006-SSA2-2013).

**Tabla 1.** Clasificación de fármacos contra la Tuberculosis (OMS,2018)

| Grupo | Tipo de fármacos                         | Fármacos   |
|-------|--|--|
| 1     | Fármacos orales de primera línea         | Isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida.   |
| 2     | Fármacos inyectables                     | Estreptomicina, kanamicina, amikacina, capreomicina.   |
| 3     | Fluoroquinolonas                         | Ofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino.   |
| 4     | Bacteriostáticos orales de segunda línea | Etionamida, protionamida, cicloserina, terizidona, ácido p-aminosalicílico.  |
| 5     | Fármacos de eficacia poco clara          | Clofazimina, amoxicilina/clavulanato, claritromicina, linezolid, tioacetazona, imipenem/cilastatina, dosis altas de isoniazida y claritromicina. |

Cada uno de estos fármacos de primera línea tiene un mecanismo de acción particular. En el caso de la isoniazida, inhibe la síntesis de los ácidos micólicos de la pared bacteriana, lo que permite que el microorganismo sea susceptible a la acción de radicales de oxígeno reactivo y a otros elementos. La rifampicina se une a la RNA polimerasa lo que ocasiona una interferencia en la replicación de la bacteria. La pirazinamida genera un pH ácido intrabacteriano, lo que causa un efecto mortal para la bacteria, además que tiene una sinergia con isoniazida y rifampicina (Somoskovi *et al*, 2001). El mecanismo de acción

del etambutol no ha sido completamente elucidado, sin embargo, se cree que interfiere en el metabolismo del rRNA, la síntesis de fosfolípidos, la síntesis de ácidos micólicos y síntesis de polisacáridos de la pared celular bacteriana (Victor, Van Helden & Warren, 2002).

Además de los fármacos de primera línea existen otras alternativas de tratamiento; estas son los fármacos de segunda línea, los cuales se utilizan cuando los de primera línea no funcionan debido a resistencia de la bacteria o sensibilidad del paciente a estos fármacos. Estos fármacos de segunda línea son aquellos que se encuentra en el grupo 2 al 5 de acuerdo con la clasificación de la OMS de los fármacos para el tratamiento de la TB (Tabla 1) (OMS, 2018). Sin embargo, estos fármacos de segunda línea presentan mayor toxicidad y efectos adversos (Coyne *et al*, 2009). El uso de estos fármacos ha salvado vidas de pacientes con TB, no obstante, la administración incorrecta o el mal uso de estos fármacos ha provocado que algunas cepas de *M. tuberculosis* presente resistencia a estos fármacos (Kamholz, 2002).

## **2.5. Resistencia a fármacos de *M. tuberculosis***

La TB con resistencia a fármacos es un gran reto a nivel mundial, por las dificultades en su control y tratamiento. En las ciudades en vías de desarrollo esta problemática se acentúa mayormente con alta tasa de incidencia, ya que tienen esquemas de tratamiento deficiente (Udwadia *et al.*, 2012).

La OMS establece que un enfermo de TB presenta resistencia a fármacos, cuando se confirme de manera *in vitro* esta resistencia a uno o más fármacos de primera y/o segunda línea. La OMS clasifica la resistencia a fármacos de *M. tuberculosis* en cuatro definiciones: Monorresistente, resistencia a un fármaco de primera línea; Polirresistente, cepas resistentes a más de un fármaco de primera línea excepto isoniazida y rifampicina; Multifarmacorresistente (TB-MFR), cepas resistentes como mínimo a isoniazida y rifampicina; y TB con resistencia extendida (XFR), son cepas resistentes a isoniazida,

rifampicina, a una quinolona, y por lo menos a uno de los fármacos inyectables de segunda línea (OMS, 2013a; Falzon *et al*, 2017).

El tratamiento que se utiliza para TB-MFR puede ser hasta de dos años utilizando fármacos de segunda línea, sin embargo, estos presentan más efectos tóxicos y un mayor costo económico que los fármacos de primera línea (Coyne *et al*, 2009).

A nivel mundial se estimaron 490 mil casos nuevos y 190 mil muertes de TB-MFR (OMS, 2017). En México se reportaron 835 casos de TB resistente a fármacos de los cuales 595 casos fueron de TB-MFR (CENAPRECE, 2017).

La resistencia a fármacos es un fenómeno que ha sido objeto de estudio de diversas investigaciones, sin embargo, aún no se han elucidado completamente los mecanismos moleculares involucrados en este fenómeno. Dentro de estos mecanismos involucrados, el más estudiado o al que le han denominado mecanismo primario de resistencia a fármacos es la acumulación de mutaciones en genes blanco de los fármacos (Gygli *et al*, 2017), además de mutaciones en genes de la RNA polimerasa, genes de la regulación transcripcional, genes de vías de reparación del DNA, genes que codifican para componentes de la pared celular y transportadores de membrana (Casali *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2015; Yamchi *et al.*, 2015). Se han identificado diversas mutaciones en genes, los cuales se han identificado como marcadores de resistencia para determinado fármaco, mostrando algunos ejemplos en la Tabla 2.



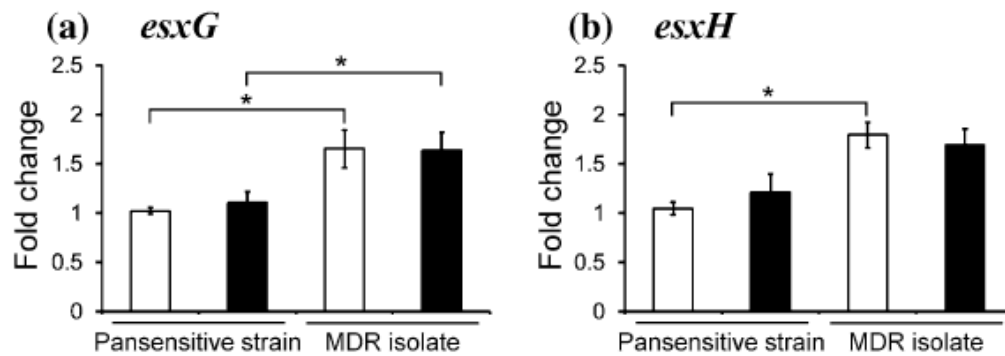
**Tabla 2.** Genes marcadores de resistencia a fármacos (Almeida & Palomino, 2011).

| Gen              | Producto génico                   | Fármaco          |
|------------------|-----------------------------------|------------------|
| <i>katG</i>      | Catalasa/peroxidasa               | Isoniazida       |
| <i>inhA</i>      | Enoil reductasa                   |                  |
| <i>ahpC</i>      | Alquil hidroperóxido reductasa    |                  |
| <i>rpoB</i>      | Subunidad-β de la RNA polimerasa  | Rifampicina      |
| <i>pncA</i>      | Pirazinamidasa                    | Pirazinamida     |
| <i>rpsL</i>      | Proteína ribosomal S12            | Estreptomicina   |
| <i>rrs</i>       | rRNA 16S                          |                  |
| <i>gidB</i>      | 7-metilguanosina-metiltransferasa |                  |
| <i>EmbB</i>      | Arabinosil metiltransferasa       | Etambutol        |
| <i>gyrA/gyrB</i> | DNA girasa                        | Fluoroquinolonas |

A pesar de la identificación de genes marcadores de resistencia a fármacos, se ha demostrado que la presencia de estas mutaciones es variable en las diferentes cepas, y que su frecuencia presenta un amplio rango de variación dependiendo del área geográfica de procedencia, y por otras circunstancias no definidas (Nguyen, 2016).

Además de la presencia de mutaciones, existen otros mecanismos moleculares involucrados de *M. tuberculosis* en eludir la acción de los fármacos; estos pueden ser: su pared celular tan característica (grosor), la variabilidad genética entre cepas, mecanismos para degradar los fármacos por enzimas o modificaciones químicas (Almeida & Palomino, 2011); además que se han reportado diferencias en la expresión de diversos genes como aquellos involucrados en la fosforilación oxidativa, los de ribosomas, los de transportadores ABC, y los de transportadores de secreción de fármacos (Machado *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2015; Yamchi *et al.*, 2015).

Recientemente nuestro grupo de trabajo realizó un análisis comparativo de la expresión de genes entre una cepa sensible y una cepa multifarmacorresistente de *M. tuberculosis*, en donde se observó una sobreexpresión de los genes *esxG*, *esxH*, *rpsA*, *esxI* y *rpml* y una represión en la expresión de los genes *lipF*, *groES* y *narG* en la cepa multifarmacorresistente comparándola con la cepa sensible de *M. tuberculosis*. Estos resultados sugieren que estos genes pudieran estar involucrados en algún mecanismo de resistencia a fármacos de manera directa o indirecta (Peñuelas-Urquides *et al*, 2013) (Figura 1).



**Figura 1. Resultados de la expresión diferencial de los genes *esxG* y *esxH* entre una cepa sensible y una multifarmacorresistente de *M. tuberculosis*.** Pansensitive strain- cepa sensible, MDR isolate-cepa multifarmacorresistente (Peñuelas-Urquides *et al*, 2013).

Además, en otro estudio se evaluó la expresión de los genes *esxG*, *esxH*, *infA*, *groES*, *rpml*, *rpsA* y *lipF* en 24 aislados clínicos de *M. tuberculosis* con diferentes perfiles de resistencia a fármacos observando una gran variabilidad en la expresión de estos genes entre los aislados clínicos, demostrando el efecto de la variabilidad genética en la resistencia a fármacos (González-Escalante *et al.*, 2015).

Los genes *esxG* y *esxH* son el objeto de estudio del presente proyecto, con el fin de continuar con la búsqueda de la relación de estos genes y la resistencia a fármacos de *M. tuberculosis*.

## 2.6. Características de los genes *esxG* y *esxH*

Los genes *esxG* y *esxH* se encuentran en un clúster denominado Esx-3, el cual pertenece a una familia de clústeres denominada ESAT-6 (Abdallah *et al.*, 2007).

### 2.6.1. Sistema de secreción ESAT-6

En un análisis de la cepa atenuada BCG, la cual es producto de eliminaciones en el genoma de *M. bovis*, se encontró una región eliminada de esta cepa de 9.5 kpb a la cual se le denominó región de diferencia uno (RD1). Dentro de esta región RD1 se encontraron los clústeres de genes ESAT-6 o Esx1, los cuales codifican para un sistema de secreción (Brodin *et al.*, 2004). Este sistema de secreción se ha clasificado de tipo VII, de acuerdo con la clasificación existente para las bacterias Gram negativas la cual va del tipo I al VII; colocando en este último al sistema ESAT-6 debido a la similaridad de la pared celular que presenta *M. tuberculosis* con las Gram negativas, por su capa de ácidos micólicos la cual es como una segunda barrera (Abdallah *et al.*, 2007).

En el genoma de *M. tuberculosis* se encontraron cinco copias de este sistema de secreción Esx tipo VII, los cuales se denominaron Esx del 1 al 5, presentando genes homólogos entre estos sistemas; de manera que estos sistemas tienen similitudes, pero no se complementan (Houben, Korotkov, & Bitter, 2014). Además, recientemente se encontraron secuencias del sistema Esx en plásmidos de *Mycobacterium* (Dumas *et al.*, 2016).

De manera general los sistemas de secreción Esx están compuestos por un complejo ligado a membrana con: cuatro componentes conservados Esx (EccB, EccC, EccD y MycP), proteínas asociadas de tipo Esx específicas (EspA, EspB, EspC, EspG, etc.) y las proteínas secretadas o exportadas como ESAT-6 y CFP-10 y proteínas PE y PPE (Houben, Korotkov, & Bitter, 2014).

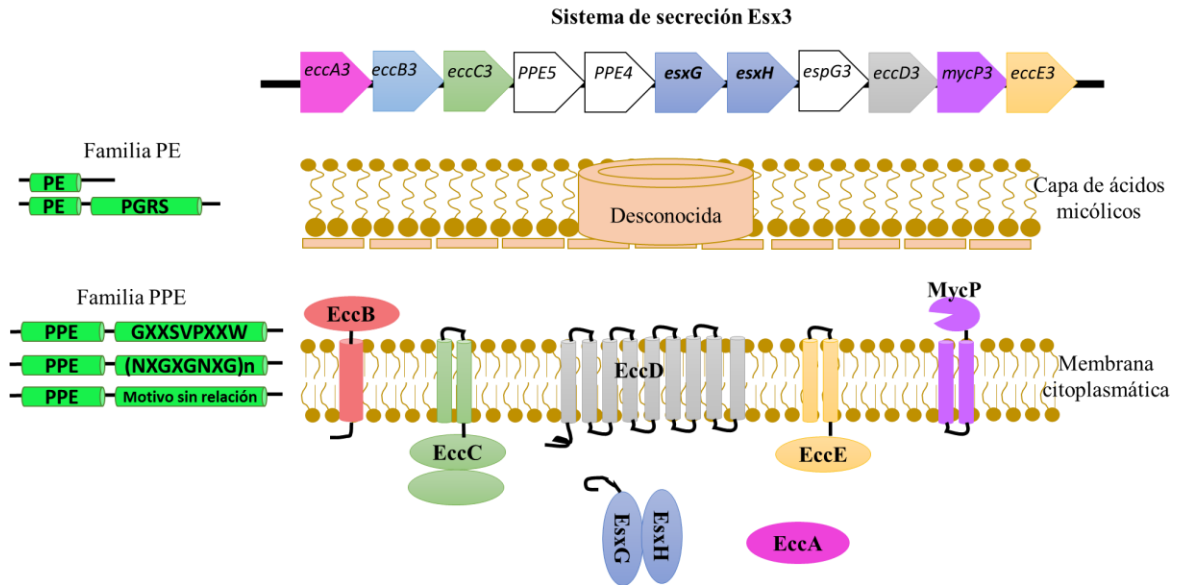
De los cinco sistemas Esx, el sistema Esx-3 es el que tiene más genes conservados entre diferentes especies de *Mycobacterium*; de tal forma que los genes pertenecientes al sistema Esx-3 tienen una función única y crucial (Stinear *et al*, 2008; Serafini *et al*, 2009; Sweeney *et al.*, 2011).

El sistema Esx-3 se regula por hierro, zinc y manganeso, así estos metales activan proteínas metalo-reguladoras, las cuales regulan negativamente al clúster Esx-3 (Rodríguez *et al*, 2002; Maciag *et al*, 2007; Pandey *et al.*, 2015).

Dentro de las características del sistema Esx-3, se ha reportado que el sistema es promotor de la virulencia y necesario para la sobrevivencia de *M. tuberculosis* (Serafini *et al.*, 2009; Sweeney *et al.*, 2011).

### **2.6.2. Características de *esxG* y *esxH***

Como se mencionó previamente, estos genes forman parte del sistema Esx-3 y codifican para proteínas que son secretadas por el sistema Esx-3 (Figura 2). La secuencia del gen *esxG* es de 294 pb y del gen *esxH* es de 291 pb, su producto codificante es de 97 aminoácidos para EsxG y 94 aminoácidos para EsxH. Pertenecen a una familia de genes denominada *esx*, de los cuales *M. tuberculosis* presenta 23 genes denominados *esx*- de la A a la W, estos genes se presentan en pares en el genoma. Los productos génicos que producen tienen características similares, principalmente son proteínas de tamaño pequeño, tienen un motivo central WXG y forman un heterodímero (Abdallah *et al.*, 2007).



**Figura 2. Representación esquemática del sistema de secreción Esx-3.** Parte superior- representación de los genes del clúster Esx-3. Parte inferior- representación esquemática del sistema de secreción Esx-3 y sus proteínas secretoras EsxG-EsxH.

La función de las proteínas EsxG y EsxH, aún no ha sido completamente elucidada, pero se sabe que son fuertes antígenos (Skjøl *et al.*, 2002; Hervas *et al.*, 2006). Además, su rol como parte del sistema Esx-3 se demostró en un mecanismo de patogenicidad al observar que el dímero EsxG-EsxH interrumpía la función del complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (ESCRT) e impedir la maduración del fagosoma (Mehra *et al.*, 2013). También recientemente se encontró que la expresión de diversos genes se encontraba aumentada o disminuida en la fase de reactivación de *M. tuberculosis*, cuando ocurre la transición entre la forma latente y la forma activa, generando un patrón de expresión génica diferente en esta fase de reactivación comparándola con la forma activa. Dentro de estos genes se encontró que *esxG* y *esxH* estaban sobre-expresados en esta fase de reactivación, por lo que se sugiere que pueden estar involucrados en situaciones que representan estrés a la bacteria (Du, Sohaskey & Shi, 2016).

Los genes *esxG* y *esxH*, se regulan negativamente por altas concentraciones de hierro, zinc y manganeso o inducidos bajo condiciones limitadas de estos mismos. Los principales reguladores de la transcripción de *esxG* y *esxH* son los factores IdeR (Iron dependent Regulator), Zur (Zinc uptake repressor) y MntR (Manganese transport regulator); estos

factores de transcripción son proteínas metaloreguladores, las cuales en presencia del metal se unen al DNA para actuar como represores (Rodríguez *et al.*, 2002; Maciag *et al.*, 2007; Pandey *et al.*, 2015). IdeR pertenece a la familia DtxR (toxina represora de difteria) y es reguladora dependiente de hierro (Rodríguez *et al.*, 2002; Fontán *et al.*, 2008). Zur pertenece a la familia Fur, también se denomina FurB; y regula negativamente en presencia de zinc (Maciag *et al.*, 2007). MntR pertenece a la familia DtxR y es reguladora dependiente de manganeso (Pandey *et al.*, 2015).

## **2.7. Estrategias para el estudio de genes de *M. tuberculosis***

Para el estudio de *M. tuberculosis* se han implementado diversas estrategias, la más utilizada para los análisis funcionales de genes es inducir deleciones genómicas, y así evaluar el efecto de eliminar determinado gen en la bacteria (Raamsdonk *et al.*, 2001). Se ha utilizado la recombinación homologa, sin embargo, se ha reportado una eficiencia baja, además que la recombinación ocurre en otros sitios del genoma que no son el sitio blanco (Nakashima & Miyazaki, 2014). Una herramienta muy utilizada y simple ha sido la tecnología del RNA antisentido (Darsonval *et al.*, 2016).

La tecnología del RNA antisentido ha sido definida como polímeros sintéticos o naturales que reconocen específicamente e inhiben secuencias blanco, usualmente los blancos son mRNA (Good, 2003). Este mecanismo provoca la reducción o alteración del mRNA o bien la inhibición de la traducción. Este mecanismo no provoca la modificación del DNA genómico por lo tanto es muy utilizado para el estudio de genes esenciales en los organismos, debido a que provoca una disminución en la expresión génica (Rasmus, Sperling-Petersen & Mortensen, 2007). Se han utilizado diversas estrategias para generar la atenuación de genes, diseñando un RNA antisentido que se componga de toda la secuencia codificante en antisentido la cual hibride con el mRNA, o bien secuencias que hibriden con el sitio de unión a ribosoma o en alguna parte de la región regulatoria (Rasmussen *et al.*, 2007; Cahndoli *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2016). Otros autores han generado una inhibición del 66% en diversos genes utilizando esta tecnología tanto en *M. tuberculosis* como en *M. smegmatis*, además han demostrado que no existen efectos

polares con genes que se encuentran en el extremo 5' en un operón (Kang *et al.*, 2013; Chandolia *et al.*, 2014); sin embargo, otros autores reportan efectos polares en un operón en los genes que se encuentran en el lado 3' de los genes blanco (Wang & Kuramitsu, 2003; Kole, Krainer & Altman, 2012; Darsonval *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2016).

Como una alternativa a estas tecnologías, se ha utilizado la tecnología CRISPR-CAS9 para editar los genomas de diversas especies generando alta eficiencia en su edición (Wang *et al.*, 2016). Este sistema fue descubierto en arqueas y bacterias como un tipo de sistema inmune adaptativo, el cual representa resistencia frente a entes portadores de material genético (Mojica & Montolieu, 2016).

Esta herramienta de CRISPR-CAS9 se basa en el sistema de tipo II, que consta de dos componentes principales un RNA guía (RNAg) que reconoce la secuencia nucleotídica blanco de forma complementaria y una nucleasa (CAS9) que realiza el corte en el DNA blanco, para que después esta escisión sea reparada por los propios sistemas de reparación del organismo. Además, en el DNA blanco debe existir la secuencia PAM que será reconocida por la nucleasa (Sander & Joung, 2014); así el sistema puede modificar el DNA genómico *in vivo* eficientemente (Zala *et al.*, 2016).

Se han creado diversas adaptaciones como mutar los dos dominios de la nucleasa provocando que no ocurra ningún corte en el DNA, en este caso la proteína Cas9 junto con el RNAg se unirá al DNA blanco inhibiendo por efecto alostérico a la RNA polimerasa provocando la inhibición de la transcripción, denominándola CRISPR de interferencia o CRISPRi (Hsu, Lander & Zhang, 2014).

Para *Mycobacterium* se han reportado pocas investigaciones que hayan utilizado CRISPR-Cas; y en todas estas investigaciones el sistema utilizado ha sido CRISPRi debido a que no ha sido posible utilizar el sistema CRISPR-Cas con los dos dominios nucleasas activos ya que *Mycobacterium* no presenta el sistema CRISPR de tipo II (He, Fan, & Xie, 2012).

A partir del sistema CRISPRi se ha logrado silenciar diversos genes (genes esenciales, genes blanco de fármacos) de *M. tuberculosis*, *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG, obteniendo un silenciamiento de 4 veces cuando se ha utilizado la nucleasa Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (Singh *et al*, 2016) y un silenciamiento de hasta 100 veces cuando se ha utilizado la nucleasa Cas9 de *S. thermophilus* (Rock *et al*, 2017). En todos los casos se genera un knock down del gen blanco.

Por otro lado, para el estudio de genes de *M. tuberculosis* se ha utilizado modelos de estudio del género de *Mycobacterium*, debido al riesgo relativo de manipular los cultivos de esta bacteria; dentro de estos modelos uno de los más utilizados es *M. smegmatis* (Gonzalez-Merchand *et al.*, 2012).

### **2.7.1. Características de *Mycobacterium smegmatis***

*M. smegmatis*, es aeróbico quimiorganotrofo, no móvil, de crecimiento rápido con un tiempo de generación de 3-4 horas, sus colonias son visibles a los 3 o 5 días, normalmente se encuentran en suelo y agua, y no son patógenas para humanos o animales (Etienne *et al*, 2005). Sin embargo, se ha reportado que podría comportarse como patógeno oportunista de humanos, debido a que se le ha asociado a lesiones en tejidos blandos debido algún trauma o cirugía. Para la manipulación de *M. smegmatis* se requiere un laboratorio de bioseguridad nivel I, además es cultivable en la mayoría de los medios sintéticos o complejos (Brown-Elliott & Wallace, 2002; Gonzalez-Merchand *et al.*, 2012).

*M. smegmatis* ha sido utilizada como modelo de estudio ya que presenta diversas características en común con *M. tuberculosis*, entre estas es que presenta alta homología entre diversos genes como los de virulencia y en rutas metabólicas (Altaf *et al*, 2010). Esta bacteria se ha utilizado para expresar diversos genes nativos de *M. tuberculosis* además de la evaluación funcional de genes ortólogos (Landick *et al*, 2014; Mi *et al*, 2017). En nuestro grupo de investigación se evaluó el efecto de fármacos de primera línea en *M. smegmatis* sobre-expresando un gen nativo de *M. tuberculosis*, mostrando la implicación de este gen en la resistencia a fármacos de *M. tuberculosis* (Arriaga-Guerrero, 2016).



La cepa más utilizada de *M. smegmatis* es mc<sup>2</sup>155. Esta cepa es una mutante de *M. smegmatis*, y presenta una mayor eficiencia de transformación con DNA plasmídico desde 10 a 100 veces más que la cepa parental, utilizando electroporación (Snapper *et al*, 1990).

En relación con los sistemas de secreción Esx de tipo VII, *M. smegmatis* presenta solo tres de los cinco sistemas que presenta *M. tuberculosis*, estos son Esx1, 3 y 4 (Gey *et al.*, 2001); los cuales a nivel de proteína presentan entre 60 y 75% de similitud con *M. tuberculosis* H37Rv, sin presentar ninguna delección, cambio de marco de lectura o codón de paro en los genes de estos sistemas. La transcripción del sistema Esx3 es regulada por hierro y zinc en *M. tuberculosis*, sin embargo, se ha demostrado que en *M. smegmatis* solo es regulada por hierro y no por zinc (Serafini *et al*, 2009). En un análisis *in silico* realizado en el laboratorio se observó que los genes *esxG* y *esxH* presentan a nivel de nucleótidos 62 y 73.2% de similitud y a nivel de proteína 72 y 76% de similitud respectivamente con *M. tuberculosis* H37Rv.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis es una enfermedad reemergente causada principalmente por *M. tuberculosis*, y aunque ya existen terapias contra esta enfermedad, su eficacia ha disminuido por la aparición de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a estos fármacos. Se ha encontrado que existen mutaciones específicas en genes blanco de estos fármacos que causan la resistencia, sin embargo, no en todos los casos que se presenta la resistencia a fármacos se presentan estas mutaciones, por lo que otros mecanismos moleculares pueden estar involucrados.

El conocer estos mecanismos sería beneficioso ya que podría tener una aplicación directa en el diagnóstico temprano de tuberculosis ocasionada por cepas resistentes a fármacos, lo cual permitiría mejorar la implementación de un tratamiento oportuno y, por otro lado, identificar más blancos terapéuticos.

En la búsqueda de estos mecanismos nuestro grupo de trabajo evaluó la expresión génica entre una cepa multifarmacorresistente y una sensible de *M. tuberculosis*, encontrando genes con diferencias en su expresión, dentro de estos genes se encontraron *esxG* y *esxH* los cuales estaban sobre-expresados en la cepa multifarmacorresistente, lo que nos sugiere que pudieran estar involucrados en el fenotipo de resistencia a fármacos.

Por lo tanto, en el presente proyecto se pretende evaluar el efecto de la inhibición de estos genes en un modelo de *M. tuberculosis* en presencia de fármacos de primera línea.

## 4. HIPÓTESIS

La inhibición de los genes *esxG* y *esxH* en *M. smegmatis* como modelo de *M. tuberculosis*, tiene un efecto en la resistencia a fármacos de primera línea.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la inhibición de los genes *esxG* y *esxH* en la resistencia a fármacos de primera línea en *M. smegmatis* como modelo de *M. tuberculosis*.

### **5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Inhibir los genes *esxG* y *esxH* en *M. smegmatis*.
2. Evaluar la inhibición de los genes *esxG* y *esxH* en *M. smegmatis*.
3. Evaluar el efecto de la inhibición de los genes *esxG* y *esxH* en la resistencia a fármacos de primera línea en *M. smegmatis* como modelo de *M. tuberculosis*.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Cultivo de la cepa de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 modelo de *M. tuberculosis*

En este estudio se utilizó como modelo experimental de *M. tuberculosis*, la cepa de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (ATCC 700084), para su activación se cultivó en medio 7H9 suplementado con 10% de albumina bovina, dextrosa, catalasa (ADC) y 0.05% de Tween 80 y se incubó a 37°C con agitación constante. Se resembró un inóculo del cultivo activado, en medio 7H9 (con 10% ADC y 0.05% Tween 80) y en medio sólido 7H10 (suplementado con 10% de OADC), incubándolos a 37°C por 24 h. Para su conservación se tomó una porción del medio sólido para su posterior colocación en medio de preservación 7H9 adicionado con 10% ADC y 45% glicerol, almacenándolo a -70°C.

### 6.2 Inhibición de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 por medio del RNA antisentido.

Se utilizó la secuencia completa antisentido de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) para lograr la inhibición de la transcripción de estos genes.

#### 6.2.1 Amplificación y verificación de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*).

La secuencia completa antisentido de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) se generó diseñando *primers* para su amplificación utilizando el software Oligo Analyzer 3.1 de IDT y el software Oligo Calc, se agregó el sitio de la enzima de restricción *BamHI*, la secuencia fue amplificada a partir de DNA genómico utilizando los *primers*: *Msmeg\_0620-F* y *Msmeg\_0621-R* (Tabla 3) (Figura 4). Las condiciones de la mezcla de la reacción se describen en la Tabla 4 mientras que las condiciones de amplificación se describen en la Tabla 5.

**Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

| Nombre del <i>primer</i> | Gen                                  | Sitio de <i>Bam</i> HI | Secuencia 5'—3'            |
|--------------------------|--------------------------------------|------------------------|----------------------------|
| Msmeg_0620-F             | <i>esxG</i><br>( <i>Msmeg_0620</i> ) | GGATCC                 | ATGAGTCTTCTCGACGCTCACA     |
| Msmeg_0620-R             |                                      | ---                    | TCAGATACCGGTGTAGGTG        |
| Msmeg_0621-F             | <i>esxH</i><br>( <i>Msmeg_0621</i> ) | ---                    | ATGTCCCAGATCATGTACAACCTACC |
| Msmeg_0621-R             |                                      | GGATCC                 | TCATCCCCACTTGGCGCC         |
| Msmeg_sigA-F             | <i>sigA</i>                          | ---                    | GTGGCAGCGACAAAGGCA         |
| Msmeg_sigA-R             |                                      | ---                    | CTAGTCCAGGTAGTCGCGCAG      |
| Msmeg_sigA-F2            | <i>sigA</i>                          | ---                    | ACG CAA AGA CGC CGA GCT GA |
| Msmeg_sigA-R3            |                                      | ---                    | GCT CTT CGG GCG TGG GCT C  |

**Tabla 4.** Cálculos para la reacción de amplificación de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*), *esxH* (*Msmeg\_0621*) y *sigA* de *M. smegmatis*.

|                       | Genes <i>esxG</i> y <i>esxH</i> |                  |            | Gen <i>sigA</i>     |            |
|-----------------------|---------------------------------|------------------|------------|---------------------|------------|
|                       | Inicial                         | Final            | 1 reacción | Final               | 1 reacción |
| Buffer                | 10 ×                            | 1 ×              | 2.5 µL     | 1 ×                 | 2.5 µL     |
| dNTP's                | 10 mM c/u                       | 0.2 mM c/u       | 0.5 µL     | 0.2 mM c/u          | 0.5 µL     |
| MgCl <sub>2</sub>     | 50 mM                           | 3.5 mM           | 1.75 µL    | 1.5mM               | 0.75µL     |
| <i>Primer</i>         | 100 ng/µL                       | 5 ng/µL          | 1 µL       | 5 ng/µL             | 1 µL       |
| Forward               |                                 |                  |            |                     |            |
| <i>Primer Reverse</i> | 100 ng/µL                       | 5 ng/µL          | 1 µL       | 5 ng/µL             | 1 µL       |
| DNA Taq polimerasa    | 5U/ µL                          | 0.625 U 0.25U/µL | 0.125 µL   | 0.625 U<br>0.25U/µL | 0.125 µL   |
| DMSO                  | 100%                            | 5%               | 1.25 µL    | 5%                  | 1.25 µL    |
| H <sub>2</sub> O NF   | -                               | -                | 16.125     | -                   | 15.125 µL  |
| DNA                   | -                               | -                | 1 µL       | -                   | 1 µL       |
| Volumen total         | -                               | -                | 25 µL      | .                   | 25 µL      |

**Tabla 5.** Condiciones de amplificación de los genes *esxG/esxH* (*Msmeg0620*)/(*Msmeg\_0621*) y *sigA*.

| Condiciones de amplificación |                   |   |                   |
|------------------------------|-------------------|---|-------------------|
|                              |                   | Genes <i>esxG/esxH</i><br><i>(Msmeg0620)/(Msmeg_0621)</i> | Gen <i>sigA</i>   |
| Desnaturalización inicial    |                   | 95 °C / 5 minutos   | 95 °C / 5 minutos |
| 30 ciclos                    | Desnaturalización | 94 °C / 30 segundos                                       | 94 °C / 1 minutos |
|                              | Alineamiento      | 61 °C / 30 segundos                                       | 59 °C / 1 minuto  |
|                              | Extensión         | 72 °C / 30 segundos                                       | 72 °C / 1 minuto  |
| Extensión final              |                   | 72 °C / 7 minutos   | 72 °C / 7 minutos |

El producto de la amplificación de los genes se verificó mediante secuenciación automatizada utilizando el equipo 3130xl Genetic Analyzer y para la reacción de marcaje se utilizó el estuche comercial Big Dye ® Terminator v3.1 Cycle Sequencing. Se utilizaron los dos pares de *primers* diseñados para cada gen respectivamente (Tabla 3). La mezcla para la reacción de marcaje se describe en la Tabla 6, y las condiciones de marcaje (estandarizadas en investigaciones previas) se describen en la Tabla 7.

**Tabla 6.** Reacción de marcaje para secuenciación

| Reactivos                           | 1 reacción |
|-------------------------------------|------------|
| Mix de reacción v3.1                | 4 µL       |
| Buffer de secuenciación 5x          | 4 µL       |
| Oligonucleótido                     | 1 µL       |
| H <sub>2</sub> O libre de nucleasas | 10 µL      |
| DNA                                 | 1 µL       |
| Total                               | 20 µL      |

**Tabla 7.** Condiciones de la reacción de marcaje para secuenciación.

| Condiciones de la reacción de marcaje |               |           |
|---------------------------------------|---------------|-----------|
| Desnaturalización                     | 96 °C / 30 s  | 25 ciclos |
| Alineación                            | 50 °C / 15 s  |           |
| Extensión                             | 60 °C / 4 min |           |

Una vez obtenido el producto de la reacción de marcaje se continuó con la reacción para precipitar el DNA marcado, en donde a la muestra se añadieron 2 µL de EDTA (125 mM) más 2 µL de acetato de sodio (3 M), se agregaron 50 µL de etanol al 100%, y se agitó en vórtex, la reacción se incubó por 15 min a temperatura ambiente protegidas de la luz. Posteriormente se centrifugó a 2,500 g por 30 min a 4 °C desechando el sobrenadante. Para el lavado del producto marcado se agregaron 70 µL de etanol al 70 % y se centrifugó a 2,500 g por 15 min a 4 °C, desechando el sobrenadante y se dejó secar completamente. El DNA marcado se resuspendió con 10 µL de formamida y se incubó 2 min a 95 °C y posteriormente se colocó 5 min en hielo. La muestra se colocó en el equipo 3130xl para su secuenciación. Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando el software Seqscape versión 2.7. Como referencia se utilizó la secuencia depositada en el GenBank con No. CP000480.

#### **6.2.2 Clonación de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*).**

El producto de la amplificación de los genes se clonó en un vector de tránsito (pEXP-5-CT/TOPO™ TA Expression Kit), siguiendo el protocolo del estuche comercial.

Para la subclonación de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) en el vector pMV261, se recuperaron los genes a partir del vector de tránsito. La liberación del fragmento de la secuencia codificante de los genes se realizó mediante un ensayo de restricción enzimática con la enzima *Bam*HI, cada reacción con un volumen final de 15 µL que contenía 1× de Buffer 3, 1 µL de la enzima *Bam*HI, 2 µg de DNA plasmídico y agua libre de nucleasas, cada reacción se incubó toda la noche a 37°C en agitación a 300 rpm. Simultáneamente se realizó una restricción enzimática del vector pMV261 con la enzima *Bam*HI para su linearización, incubando la reacción toda la noche a 37 °C en agitación a 300 rpm. Posteriormente se desfosforiló el vector agregando 1 µL de CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) en buffer de dilución con una incubación de 1 hora a 37 °C, después se desactivó la enzima CIAP incubando a 65 °C por 15 minutos. Los fragmentos de las digestiones tanto el vector como los genes se separaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% y fueron recuperados por medio del método del



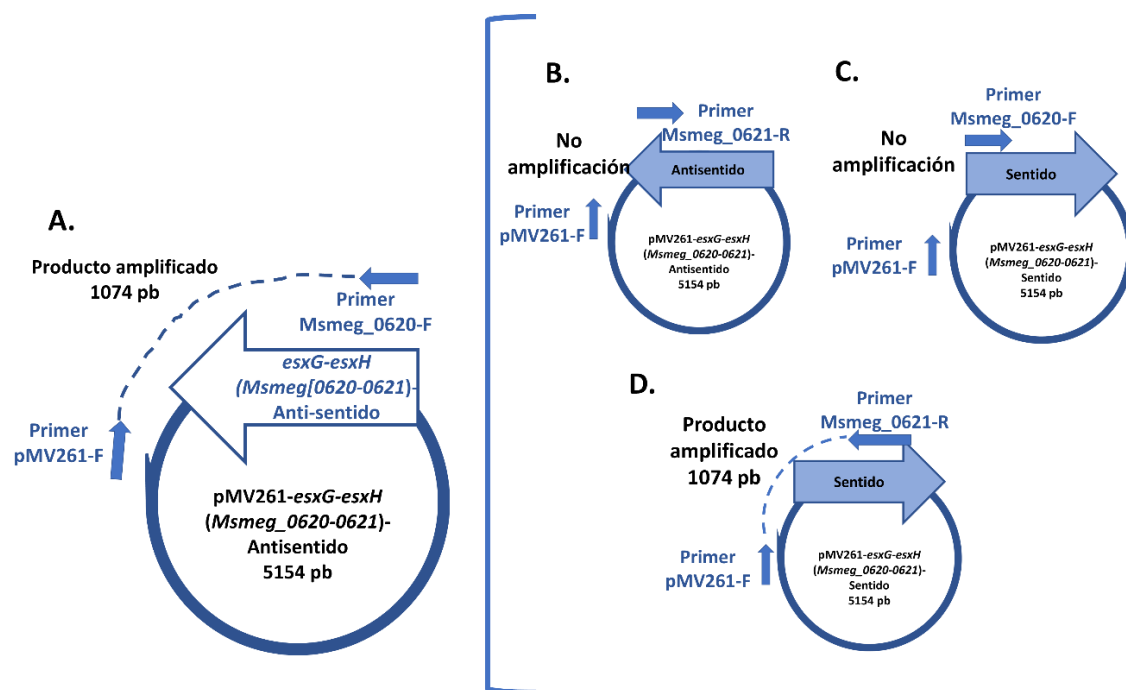
segundo pozo en el gel de agarosa, para su posterior purificación. La purificación de los genes y el vector se realizó mediante precipitación etanólica siguiendo el protocolo descrito por Sambrook & Russell (2001).

La reacción de ligación de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) en el vector pMV261, contenía un volumen final de 10 µL que contenía 87.97 ng de plásmido, 36.07 ng de inserto, 1 µL de Buffer de ligación, 0.5 µL de enzima T4 DNA ligasa y 5.83 µL de agua libre de nucleasas, incubando la reacción toda la noche a 16°C. Se realizó la transformación de la ligación mediante choque térmico utilizando el protocolo descrito por Sambrook & Russell (2001).

Para identificar la presencia de los genes se realizó una extracción de DNA plasmídico utilizando el protocolo de lisis alcalina en minipreparación ya estandarizada por Sambrook & Russell (2001). El DNA obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría en un NanoDrop 2000 (ThermoScientific, Wilmington, EUA) y su recuperación se visualizó en una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed (Biotium, Hayward, EUA).

Después se realizó una PCR punto final de cada posible candidato utilizando los cálculos para la reacción y condiciones de amplificación mencionados en la tabla 4 y 5 respectivamente.

Para seleccionar la construcción con la secuencia codificante de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) en orientación antisentido se realizó la amplificación de un fragmento correspondiente a una parte del vector y a toda la secuencia de los genes, utilizando el *primer* Forward pMV261-F 5'-GTT GTA GTG CTT GTG GTG GCA-3', el cual hibrida con el vector, en combinación con el *primer* Msmeg\_0620-F o con el *primer* Msmeg\_0621-R (Figura 3), los cálculos y las condiciones de la reacción de PCR punto final fueron las descritas para amplificar los genes *esxG/esxH* en la tabla 5 y 6, respectivamente, seleccionando el candidato en antisentido.



**Figura 3.** Estrategia para identificar la orientación de los genes *esxG-esxH* en la construcción de pMV261. **A.** Se muestra la construcción pMV261-con los genes *esxG-esxH* (*Msmeg\_0620-0621*) en antisentido, utilizando la combinación del primer Forward de pMV261 (pMV261-F) y el primer Forward del gen *esxG* (*Msmeg\_0620*) (Msmeg\_0620-F), amplificando 1074 pb. **B.** Construcción antisentido de los genes, utilizando la combinación del primer Forward de pMV261 y el primer Reverse del gen *esxH* (*Msmeg\_0621*) (Msmeg\_0621-R), la cual no genera amplificación. **C.** Construcción sentido de los genes, utilizando la combinación del primer Forward de pMV261 (pMV261-F) y el primer Forward del gen *esxG* (*Msmeg\_0620*) (Msmeg\_0620-F), la cual no genera amplificación. **D.** Construcción sentido de los genes, utilizando la combinación del primer Forward de pMV261 y el primer Reverse del gen *esxH* (*Msmeg\_0621*) (Msmeg\_0621-R), amplificando 1074 pb.

### **6.2.3 Transformación de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 con la construcción pMV261-*esxG/H* antisentido.**

Se realizó la extracción del DNA plasmídico de *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante lisis alcalina utilizando el estuche comercial QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN, Hidden, Alemania) siguiendo el protocolo señalado por la compañía. El DNA obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría en un NanoDrop 2000 (ThermoScientific, Wilmington, EUA) y se visualizó en una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed (Biotium, Hayward, EUA).

El DNA plasmídico purificado de la construcción realizada se utilizó para transformar la cepa de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, mediante electroporación. Primeramente, se creció la micobacteria en medio 7H9 adicionando 10% ADC y 0.05% de Tween 80 hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento, después se centrifugó el cultivo para resuspenderlo en agua libre de nucleasas con 10% de glicerol; este cultivo se sometió a electroporación en presencia de la construcción realizada mediante un pulso de 2.5 kV, 1000 Ohms, 25  $\mu$ FD. Posteriormente el cultivo de micobacterias electroporado se resuspendió en medio 7H9 (10% OADC) con el fármaco de selección (kanamicina) incubándolo a 37°C por 2 h; resemebrando el cultivo en medio 7H9 (10% OADC) con el fármaco de selección (kanamicina) incubándolo a 37°C durante 3 días o hasta observar colonias características visibles.

Para la confirmación de la transformación de la cepa de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 con la construcción se realizó la extracción del DNA plasmídico por lisis alcalina siguiendo el protocolo ya descrito por Sambrook & Russell (2001). Después se realizó la amplificación de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) utilizando las condiciones ya descritas en la tabla 4 y 5.

### 6.3 Evaluación de la inhibición de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155.

Se realizó la extracción de RNA total de los cultivos de *M. smegmatis* con los genes *esxG* y *esxH* inhibidos, activando el cultivo de las cepas en medio 7H9 + 10% ADC + Tween 80 al 0.05% incubándose toda la noche a 37°C. A partir del cultivo previo se inocularon 20 mL de medio 7H9 y se incubó por 20 horas a 37°C en 300rpm. Después se centrifugó y se agregó 800 µL de TRizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) transfiriéndose a tubos de FastPrep conteniendo una matriz de esferas de sílica de 0.1 mm (Matriz B, MP Biomedicals), después se centrifugó y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo para la adición de cloroformo y la precipitación del RNA utilizando isopropanol y un lavado con etanol al 70%. El RNA total obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría en un NanoDrop 2000 (ThermoScientific, Wilmington, EUA) y se visualizó en una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed (Biotium, Hayward, EUA).

Posteriormente el RNA obtenido se trató con la enzima *DNAse I* (Invitrogen, Carlsbad, CA) para digerir los restos de DNA presentes en la muestra. Se realizó una retrotranscripción del RNA total obtenido utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MLV y *primers* aleatorios siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Para evaluar la expresión de los genes *esxG* y *esxH* se realizó una PCR punto final, utilizando como templado el cDNA obtenido previamente, y los *primers* Msmeg\_0620-F y Msmeg\_0621-R que amplifican los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*), y como control endógeno se amplificó un fragmento de 551 pb del gen *sigA*, utilizando los *primers* Msmeg\_sigA-F2 y Msmeg\_sigA-R3 (Tabla 3). Las condiciones de la reacción y amplificación fueron las descritas en la tabla 4 y 5. El producto amplificado obtenido de la PCR punto final se analizó cuantitativamente para medir la intensidad de amplificación utilizando el software ImageJ2.

#### 6.4 Evaluación del efecto de fármacos de primera línea en las cepas mutadas.

La evaluación de las cepas mutantes en la condición de resistencia a fármacos en *Mycobacterium* se realizó mediante el método de microdilución en placa con el compuesto rezasurina (Martin y Palomino, 2012 y Agrawal *et al.*, 2015), usando como control la cepa tipo de *M. smegmatis* transformada solo con el vector pMV261.

Se utilizó una placa de 96 pozos, para evaluar un rango de concentraciones establecidas previamente para cada uno de los fármacos de primera línea (Arriaga-Guerrero, 2016) (Tabla 8). Posteriormente se adicionó a cada pozo 50  $\mu$ L de cultivo en fase logarítmica (DO 0.6, equivalente a 2.7 McFarland) en una dilución 1:1000.

**Tabla 8.** Concentraciones de fármacos de primera línea (Arriaga-Guerrero, 2016).

| Fármaco     | Abreviatura | Concentración stock (mg/mL) | Rango de concentraciones ( $\mu$ g/mL) |
|-------------|-------------|-----------------------------|--|
| Rifampicina | RIF         | 10                          | 50-0.05                                |
| Etambutol   | EMB         | 1                           | 80-0.05                                |
| Isoniazida  | INH         | 10                          | 216-0.25                               |

La placa se incubó a 37°C con agitación constante por 40 h, posteriormente se agregó 30  $\mu$ L de resazurina (0.2 mg/mL) en cada pozo, continuando con una incubación por 6 h más con las mismas condiciones. Una vez transcurrido el tiempo se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) observando el cambio de coloración del compuesto de resazurina el cual cambia de azul a rosa cuando existe crecimiento bacteriano. El ensayo se realizó por triplicado.

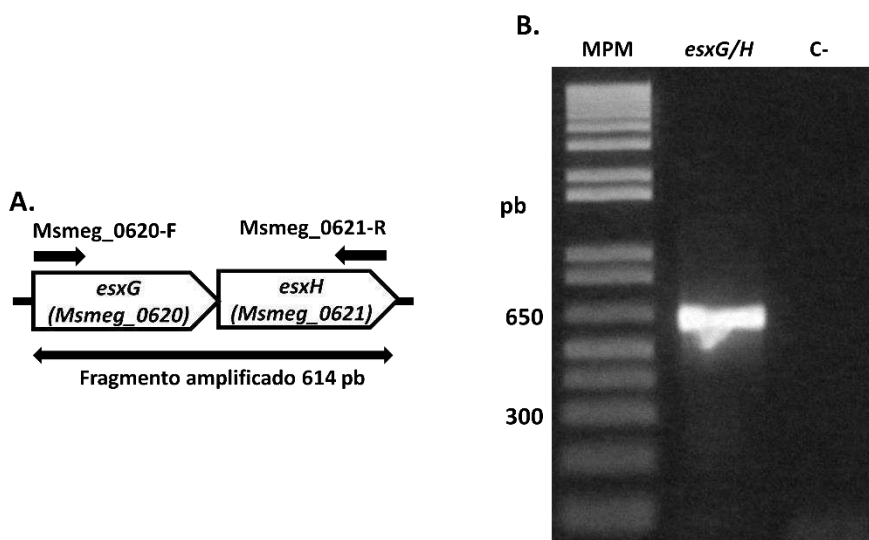
Las curvas de crecimiento de las cepas de *M. smegmatis* se realizaron cultivándolas en medio 7H9 suplementado con 10 % de ADC) y 0.05% de Tween 80, más kanamicina (20  $\mu$ g/ mL) y con las diferentes concentraciones de rifampicina (1.6, 0.8 y 0.4  $\mu$ g/mL) e isoniazida (32, 16 y 8  $\mu$ g/mL) por separado e incubándose a 37 °C con agitación constante

y midiendo la turbidez de cada cultivo en el nefelómetro KIT DENSICHEK™ PLUS STANDARDS (BIOMERIUX, SA). La primera lectura se registró a la hora cero, seguido a las 10 y 12 h (que corresponde a la fase lag, previamente determinada, (Arriaga-Guerrero,2016) para después seguir con la medición hasta las 27 horas cada 3 h. Se realizó el análisis estadístico comparando la diferencia de las pendientes entre las curvas de crecimiento de las dos cepas.

## 7. RESULTADOS

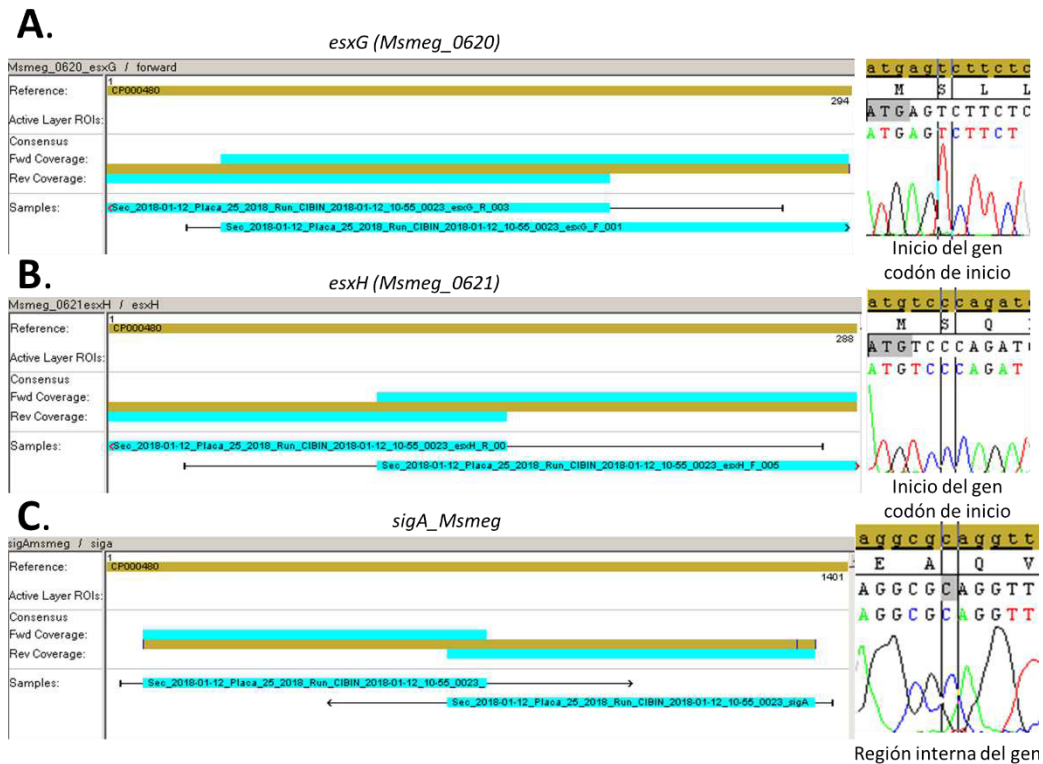
### 7.1. Inhibición de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) en *M. smegmatis* utilizando un RNA antisentido.

Para generar la secuencia completa antisentido de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) se diseñaron *primers* en base a la secuencia de referencia del GenBank de la cepa de *M. smegmatis mc<sup>2</sup> 155* con No. CP000480, los genes se amplificaron juntos utilizando el *primer* Msmeg\_0620-F y Msmeg\_0621-R, obteniendo un fragmento de aproximadamente 614 pb (Figura 4).



**Figura 4.** Amplificación por PCR de la región codificante de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) de *M. smegmatis*. A. Esquema general de la amplificación de los dos genes. B. Imagen de la electroforesis en gel de agarosa al 1%) en donde se observa el producto de la PCR de 614 pb correspondiente a la región codificante de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*), utilizando como DNA blanco el DNA genómico de *M. smegmatis mc<sup>2</sup> 155*. MPM-marcador de peso molecular 1kpb DNA plus (Invitrogen), C-, control negativo-sin DNA blanco.

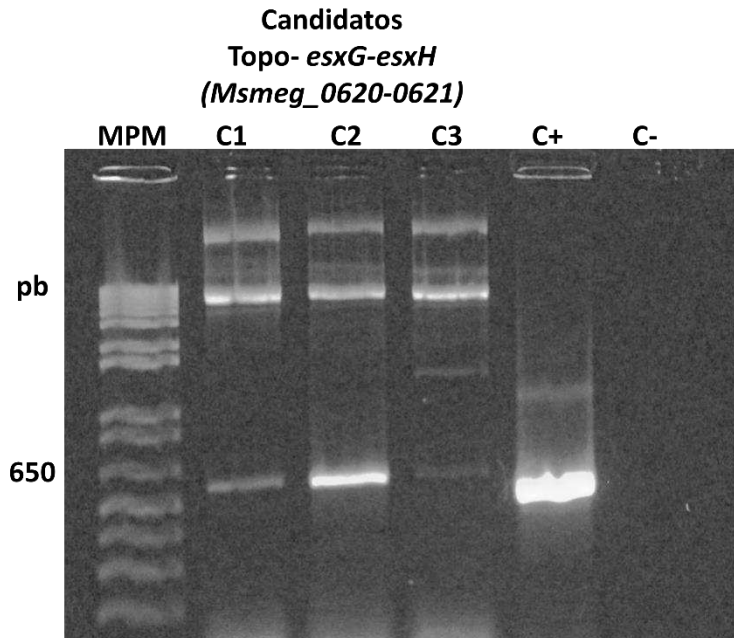
Utilizando secuenciación automatizada se verificó que la secuencia amplificada no presentara mutaciones, observando que ninguno de los tres genes presenta diferencias en sus secuencias respecto a la secuencia de referencia del Gen Bank con numero CP000480 (Figura 5).



**Figura 5. Validación del fragmento amplificado de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*), *esxH* (*Msmeg\_0621*) y *sigA* por secuenciación.** Esquema del alineamiento de las secuencias obtenidas con la secuencia de referencia CP000480 e imagen representativa del electroferograma en donde se señala el codón de inicio de los genes *esxG*, *esxH*, y la región interna del gen *sigA*. A. Gen *esxG* (*Msmeg\_0620*). B. Gen *esxH* (*Msmeg\_0621*). C. gen *sigA*.

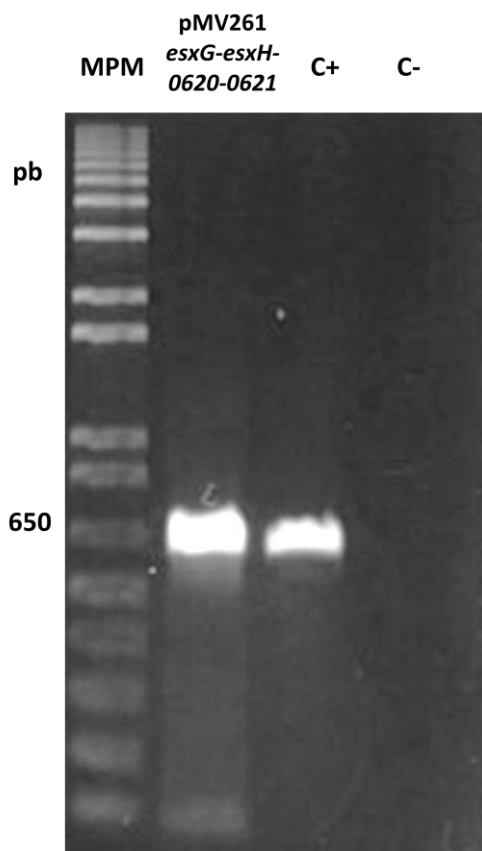
La secuencia codificante de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) se clonó en un vector de tránsito (pET101 Directional TOPO™) confirmando la presencia de los genes mediante PCR punto final observando la amplificación de la región codificante de 614 pb en 3 candidatos (Figura 6), de los cuales se seleccionó el candidato 2 para continuar con la subclonación de la secuencia.





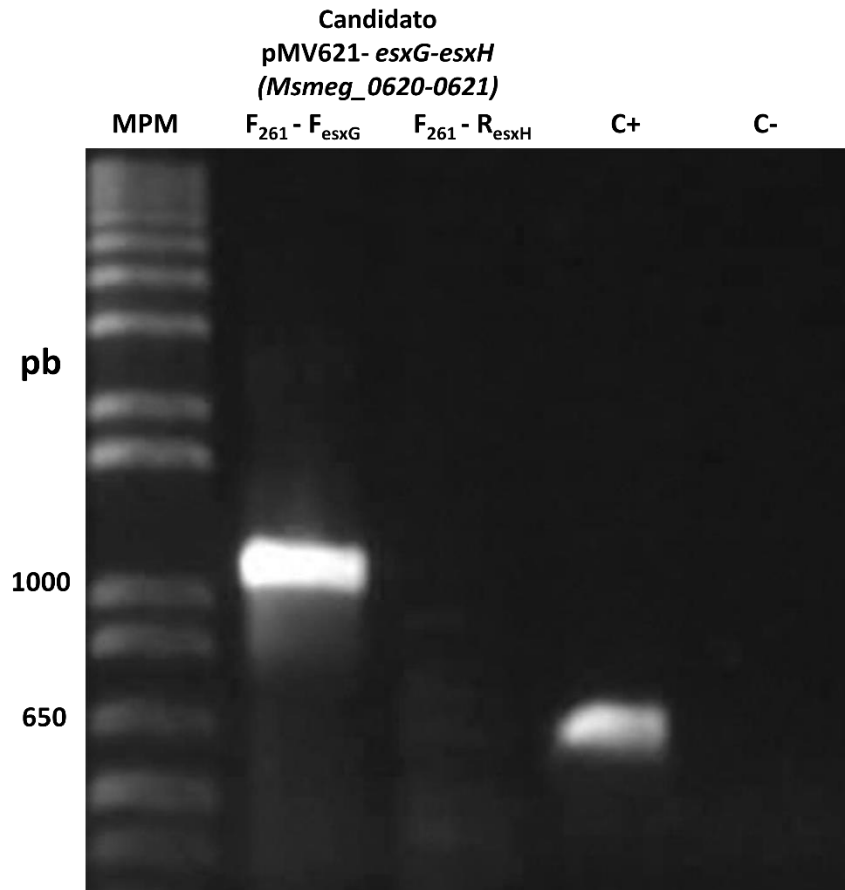
**Figura 6.** Amplificación de los genes *esxG-esxH* (*Msmeg\_0620-Msmeg0621*) de los candidatos de las construcciones en el vector de tránsito. PCR de los candidatos con la construcción Topo-*esxG-esxH*, en los tres candidatos seleccionados se observa la presencia de un fragmento de 614 pb correspondiente a la amplificación de los genes. C1, C2 y C3, representan cada candidato de la construcción Topo-*esxG-esxH* (*Msmeg\_0620-Msmeg0621*). C+, control positivo de la PCR utilizando como DNA templado el DNA genómico de *M. smegmatis*. C- indica el control negativo de cada reacción sin DNA. MPM indica el marcador de peso molecular (1kb DNA plus, invitrogen).

Con la finalidad de subclonar los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) en el vector específico de micobacterias, pMV261, estos genes fueron liberados a partir del vector de tránsito por medio de una digestión enzimática utilizando la enzima *BamHI*, así mismo se linearizó el vector pMV261 con *BamHI* y se desfosforiló, purificando los genes y el vector, para su posterior ligación y transformación en *E. coli DH5α*; obteniendo candidatos y confirmando su presencia por medio de una PCR punto final observando la amplificación de un fragmento de aproximadamente 614 pb (Figura 7).



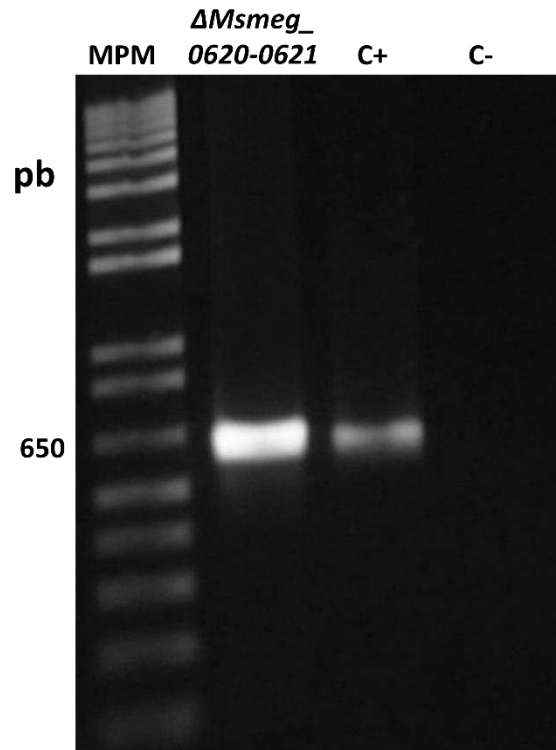
**Figura 7.** Amplificación de los genes *esxG-esxH* (*Msmeg\_0620-Msmeg0621*) del candidato de la construcción pMV261-*esxG-esxH* (*Msmeg\_0620-0621*). PCR del candidato con la construcción pMV261-*esxG-esxH*, observando la presencia de un fragmento de 614 pb correspondiente a la amplificación de los genes. C+, control positivo de la PCR utilizando como DNA templado el DNA genómico de *M. smegmatis*. C- indica el control negativo de cada reacción sin DNA. MPM indica el marcador de peso molecular (1kb DNA plus, invitrogen).

El siguiente paso fue la caracterización del sentido en que se insertaron los genes en el vector pMV261, con la finalidad de obtener un candidato con los genes en antisentido. La orientación se identificó utilizando una PCR punto final, utilizando la combinación de un *primer* que alineara en el vector y otro *primer* que alineara en los genes insertados (Figura 3). Se confirmó la orientación antisentido de los genes en el vector, visualizando la amplificación de un fragmento de aproximadamente 1074 pb al utilizar la combinación de *primers* pMV261-F y *Msmeg\_0620-F*; mientras que al utilizar la combinación de *primers* de pMV261-F y *Msmeg\_0621-R* no se observa amplificación (Figura 8).



**Figura 8.** PCR para identificar el sentido de los genes *esxG-esxH* (*Msmeg\_0620-0621*) en el vector **pMV261**. F<sub>261</sub>, señala el *primer* Forward de pMV261. F<sub>esxG</sub>, señala el *primer* Forward del gen *esxG* (*Msmeg\_0620*). R<sub>esxH</sub>, señala el *primer* Reverse del gen *esxH* (*Msmeg\_0621*). MPM, indica el marcador de peso molecular (1kb DNA plus, invitrogen). C+, control positivo utilizando los *primers* para amplificar a los genes *esxG-esxH* (*Msmeg\_0620-0621*). C- indica el control negativo de la reacción sin DNA.

La construcción con la región codificante de los genes en antisentido se utilizó para generar la cepa de *M. smegmatis*  $\Delta$ *Msmeg\_0620-0621*; para confirmar la presencia de la construcción se realizó extracción de DNA plasmídico y por medio de una PCR punto final de los genes se observó una amplificación de un fragmento de aproximadamente 614 pb (Figura 9).



**Figura 9.** Confirmación de la presencia de la construcción pMV261-*esxG-esxH* (*Msmeg\_0620-0621*) en *M. smegmatis*. MPM- marcador de peso molecular 1kpb DNA plus (Invitrogen).  $\Delta Msmeg\_0620-0621$ , cepa de *M. smegmatis* transformada con la construcción pMV261-*esxG-esxH* (*Msmeg\_0620-0621*), con los genes inhibidos. C+, control positivo con DNA genómico de *M. smegmatis*. C-, control negativo de la reacción, sin DNA templado.

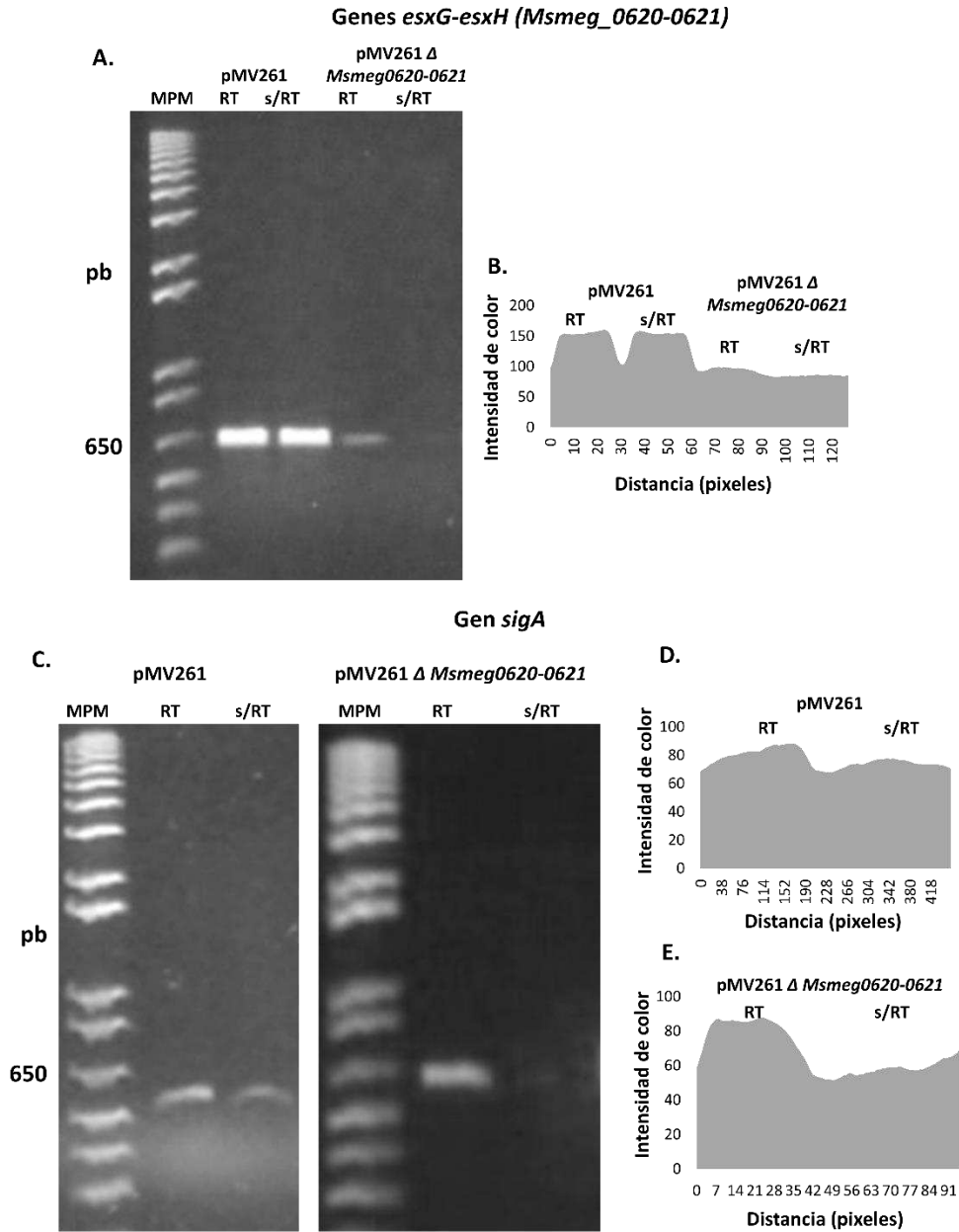
### 7.3. Evaluación de la inhibición de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*)

Con el objetivo de evaluar la inhibición de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) en la cepa  $\Delta Msmeg\_0620-0621$ , se realizó la extracción de RNA total de las dos cepas (*M. smegmatis*-pMV261 y  $\Delta Msmeg\_0620-0621$ ) y para comprobar de la inhibición de los genes por medio del RNA antisentido se amplificaron mediante PCR punto final utilizando el cDNA obtenido como templado.

Se observa como producto de la amplificación de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) un fragmento correspondiente al esperado de 614 pb aproximadamente (Figura 4) tanto en la cepa *M. smegmatis*-pMV261 como en la cepa  $\Delta Msmeg\_0620-0621$  (Figura 10A). También se amplificó el gen *sigA* como control endógeno y se observa un fragmento correspondiente al esperado de 551 pb aproximadamente (Figura 10C).

El producto amplificado a partir de la cepa de *M. smegmatis*-pMV261 en comparación de la cepa  $\Delta Msmeg\_0620-0621$  presenta mayor intensidad (Figura 10A) y en el caso del control, el producto amplificado del gen *sigA* muestra la misma intensidad en ambas cepas (Figura 10C).

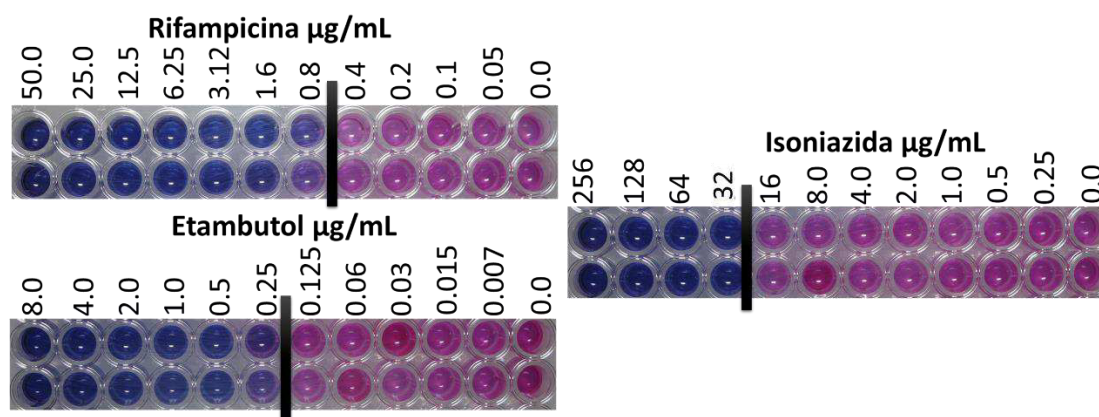
Para corroborar este efecto observado, se utilizó el software ImageJ para cuantificar la intensidad de los fragmentos obtenidos, de tal forma que al comparar la intensidad del producto de la amplificación de los genes *esxG/esxH* entre las dos cepas, se observa una diferencia del 40% entre la intensidad de la cepa de *M. smegmatis*-pMV261 en comparación de la cepa  $\Delta Msmeg\_0620-0621$ , observando una disminución en esta última (Figura 10B). En el caso del producto amplificado del gen *sigA* se observa que los valores de intensidad mostrados por el software no tienen diferencias entre una cepa y otra (Figura D y E). Verificando con estos datos la inhibición de los genes de interés por el RNA antisentido.



**Figura 10. Evaluación de la inhibición de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) de *M. smegmatis*.** A, C. Electroforesis de la amplificación de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*)-*esxH* (*Msmeg\_0621*) y *sigA* respectivamente, observando un fragmento de 614 y 551 pb. B, D y E. Imágenes de las gráficas obtenidas de los datos de la cuantificación de la intensidad de las bandas con el software ImageJ2, eje X, intensidad de color; eje Y, distancia en pixeles de las coordenadas correspondientes. DNA templado, cDNA obtenido de cada cepa. RT-muestra sometida a retrotranscripción. s/RT. muestra sin retrotranscriptasa. MPM- marcador de peso molecular 1kpb DNA plus (Invitrogen). pMV261, cepa transformada solo con el vector. pMV261  $\Delta$ Msmeg\_0620-0621, cepa de *M. smegmatis* transformada con la construcción pMV261-*esxG-esxH* en antisentido. C+, control positivo con DNA genómico de *M. smegmatis*. C-, control negativo de la reacción, sin DNA templado.

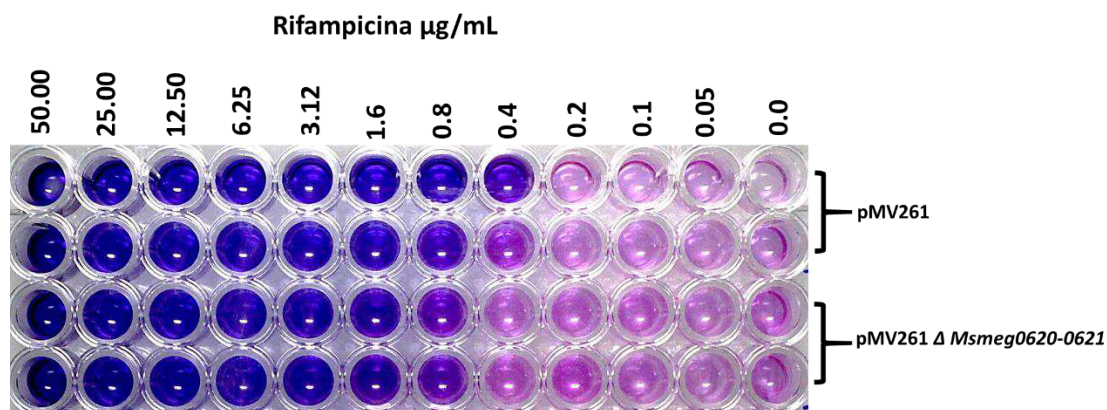
#### 7.4. Evaluación del efecto de la inhibición de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) de *M. smegmatis* en la resistencia a fármacos de primera línea

El efecto de la inhibición de los genes *esxG* y *esxH* en la farmacoresistencia se realizó utilizando el método REMA en *M. smegmatis*. Se determinó la CMI de los fármacos de primera línea rifampicina, isoniazida y etambutol en *M. smegmatis mc<sup>2</sup>155*-cepa silvestre: rifampicina 0.8 µg/mL, isoniazida 32 µg/mL y etambutol 0.25 µg/mL (Figura 11).



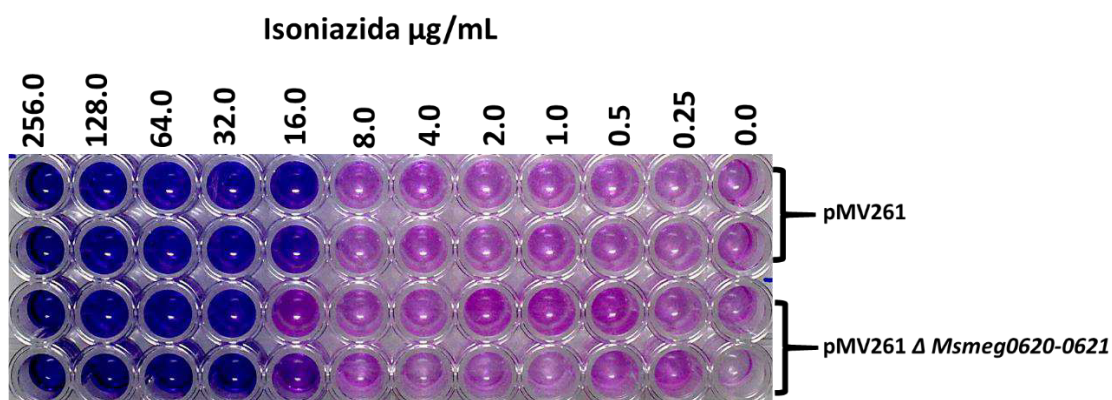
**Figura 11. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de rifampicina, isoniazida y etambutol en *M. smegmatis mc2155*.** Método de microdilución en placa con resazurina (REMA). CMI para rifampicina 0.8 ng/µL, para isoniazida 32 ng/µL y para etambutol 0.25 ng/µL.

Para evaluar el efecto de la inhibición de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) en la resistencia a fármacos de primera línea, se obtuvieron las CMI de los fármacos de primera línea rifampicina, isoniazida y etambutol en la cepa pMV261 y la cepa pMV261  $\Delta$ *Msmeg\_0620-0621*. La CMI observada para rifampicina en la cepa pMV261 fue de 0.8 µg/mL en uno de los duplicados biológicos y de 0.4 µg/mL en el otro, mientras que la CMI en la cepa  $\Delta$ *Msmeg\_0620-0621* observada fue de 0.8 µg/mL (Figura 12).



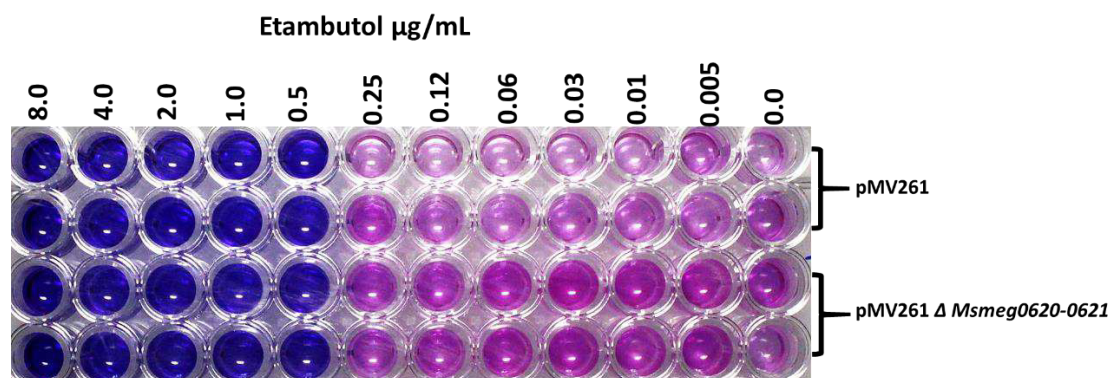
**Figura 12. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de rifampicina.** Método de microdilución en placa con el compuesto de resazurina (REMA). pMV261, cepa transformada con el vector pMV261. *pMV261 ΔMsmeg\_0620-0621*, cepa transformada con la construcción con los genes en antisentido. Crecimiento de las cepas de *M. smegmatis* en 7H9 + ADC con kanamicina (20 ng/µL) con diferentes concentraciones de rifampicina por 40 horas a 37°C.

La CMI para isoniazida observada fue 16 µg/mL para la cepa pMV261 y de 32 µg/mL para la cepa pMV261 *ΔMsmeg\_0620-0621* (Figura 13). La CMI observada para etambutol fue de 0.5 µg/mL en las dos cepas (Figura 14).



**Figura 13. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de isoniazida.** Método de microdilución en placa con el compuesto de resazurina (REMA). pMV261, cepa transformada con el vector pMV261. *pMV261 ΔMsmeg\_0620-0621*, cepa transformada con la construcción con los genes en antisentido. Crecimiento de las cepas de *M. smegmatis* en 7H9 + ADC con kanamicina (20 ng/µL) con diferentes concentraciones de isoniazida por 40 horas a 37°C.

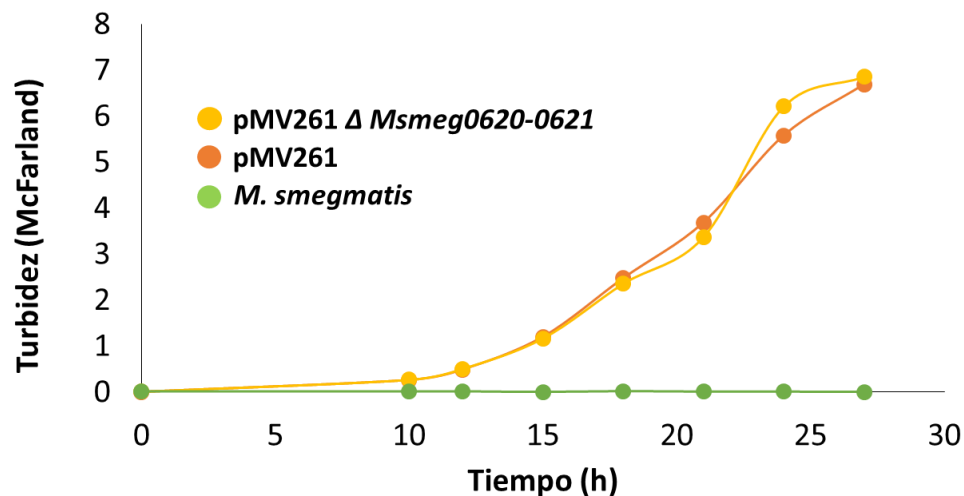




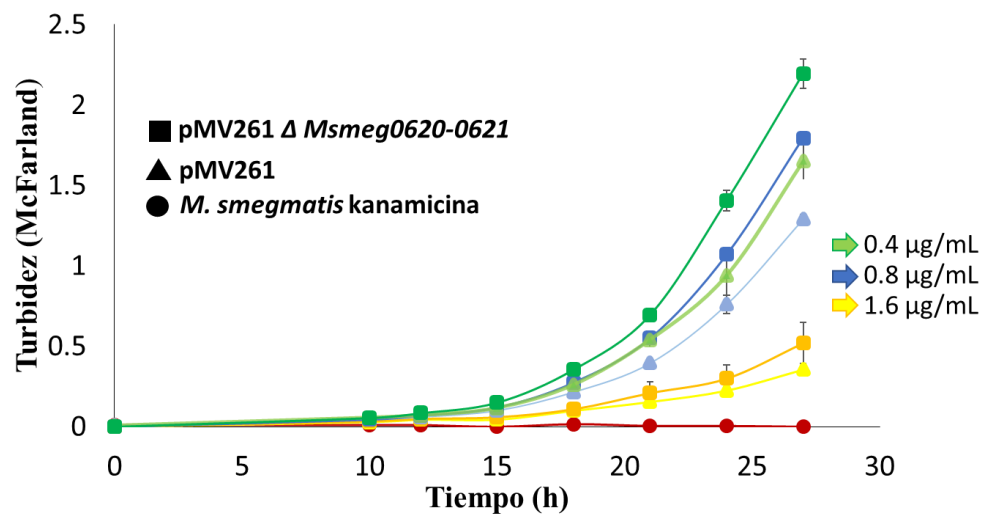
**Figura 14. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de etambutol.** Método de microdilución en placa con el compuesto de resazurina. pMV261, cepa transformada solo con el vector pMV261. *pMV261 ΔMsmeg\_0620-0621*, cepa transformada con la construcción con los genes en antisentido. Crecimiento de las cepas de *M. smegmatis* en 7H9 + ADC con kanamicina (20 ng/µL) con diferentes concentraciones de isoniazida por 40 horas a 37°C.

A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron tres concentraciones de rifampicina y tres de isoniazida para realizar curvas de crecimiento de las cepas de *M. smegmatis*. Para rifampicina se seleccionó 1.6, 0.8 y 0.4 µg/mL debido a que en un duplicado biológico no hubo crecimiento a 0.8 µg/mL en la cepa pMV261, pero en los dos duplicados biológicos de la cepa *pMV261 ΔMsmeg\_0620-0621* si se observa crecimiento (Figura 12). En isoniazida se seleccionó 32, 16 y 8 µg/mL debido a que en la cepa *pMV261* no se observa crecimiento en 16 µg/mL, pero en la cepa *pMV261 ΔMsmeg\_0620-0621* si se observa (Figura 13).

Al realizar las cinéticas de crecimiento en ausencia de los fármacos de primera línea, las cepas *M. smegmatis* pMV261 y *pMV261 ΔMsmeg\_0620-0621* presentaron un crecimiento similar utilizando kanamicina como fármaco de selección, la cepa silvestre no presentó crecimiento (Figura 15). Al realizar la cinética de crecimiento de ambas cepas en presencia de 3 diferentes concentraciones de rifampicina (0.4, 0.8 y 1.6 µg/mL) se observó una tendencia de mayor crecimiento en la cepa *pMV261 ΔMsmeg\_0620-0621* comparándola con la cepa pMV261 (Figura 16) sin presentar diferencia significativa.

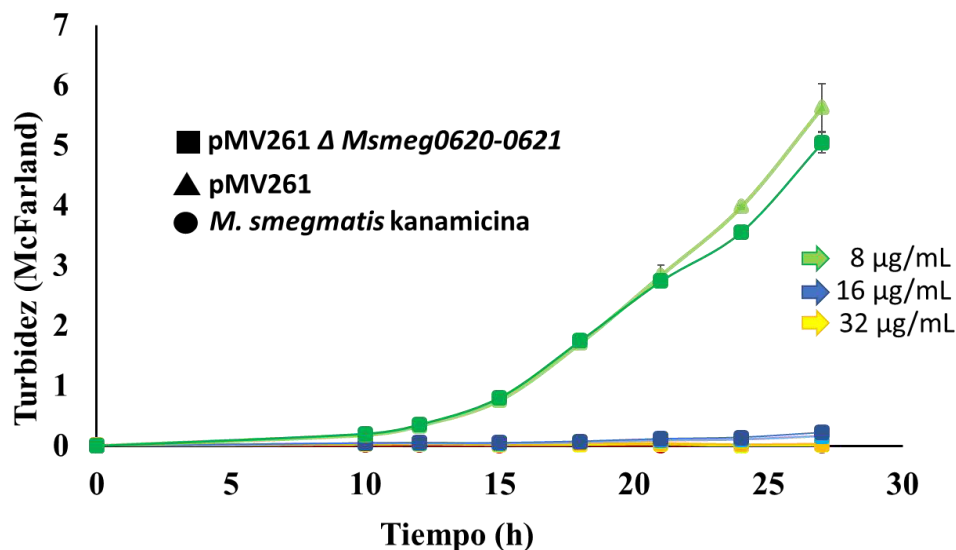


**Figura 15. Curva de crecimiento de las cepas de *M. smegmatis* en kanamicina.** Crecimiento de las cepas de *M. smegmatis* en 7H9 + ADC con kanamicina (20 µg/mL). *M. smegmatis*, cepa silvestre con kanamicina. pMV261, cepa de *M. smegmatis* transformada con el vector pMV261.  $\Delta$ Msmeg\_0620-0621, cepa de *M. smegmatis* transformada con la secuencia antisentido de Msmeg\_0620\_0621.



**Figura 16. Curva de crecimiento de cepas de *M. smegmatis* en diferentes concentraciones de rifampicina.** Crecimiento de las cepas de *M. smegmatis* en 7H9 + ADC con kanamicina (20 µg/mL) en diferentes concentraciones de rifampicina (1.6, 0.8 y 0.4 µg/mL). *M. smegmatis*, cepa silvestre con kanamicina. pMV261, cepa de *M. smegmatis* transformada con el vector pMV261.  $\Delta$ Msmeg\_0620-0621, cepa de *M. smegmatis* transformada con el antisentido de Msmeg\_0620\_0621.

El crecimiento de las cepas de *M. smegmatis* pMV261 y pMV261  $\Delta$ Msmeg\_0620-0621 bajo tres concentraciones de isoniazida (32, 16 y 8  $\mu$ g/mL) no presentó diferencias significativas entre ambas cepas (Figura 16).



**Figura 17. Curva de crecimiento de las cepas de *M. smegmatis* en diferentes concentraciones de isoniazida.** Crecimiento de las cepas de *M. smegmatis* en 7H9 + ADC con kanamicina (20  $\mu$ g/mL) en diferentes concentraciones de rifampicina (32, 16 y 8 ng/mL). *M. smegmatis*, cepa silvestre con kanamicina. pMV261, cepa de *M. smegmatis* transformada con el vector pMV261.  $\Delta$ Msmeg\_0620-0621, cepa de *M. smegmatis* transformada con el antisentido de Msmeg\_0620\_0621.

La inhibición de la transcripción de los genes mediante un RNA antisentido es un método eficaz para inhibir la expresión mediante la inhibición del mRNA modulando la expresión de las proteínas, sin embargo, como se mencionó previamente existen otros métodos para modular la expresión génica mediante la inhibición de la transcripción como la herramienta de CRISPRi; esta última es una técnica promisorio, cuyo proceso metodológico fue realizado en nuestro laboratorio, sin embargo, debido a que este proceso implicó un mayor tiempo de lo esperado, aún se encuentra en desarrollo, mostrando los avances y resultados con esta técnica en el Anexo 1.

## 8. DISCUSIÓN

La resistencia a fármacos de *M. tuberculosis* representa un gran problema mundial, y aunque existen diversos estudios enfocados a este fenómeno aún no han sido completamente elucidados todos los mecanismos moleculares involucrados. Por lo tanto, se han realizado diversos análisis de los posibles genes involucrados, por ejemplo, el análisis de la alteración de la expresión génica en donde se han encontrado diversos genes desregulados en cepas resistentes a fármacos de *M. tuberculosis* (Machado *et al*, 2012; Farhat *et al*, 2013; Peñuelas-Urquides *et al*; 2013; Yu *et al*, 2015; Yamchi *et al*, 2015). En esta búsqueda nuestro grupo de trabajo realizó una comparación entre una cepa sensible a fármacos y una multifármacorresistente de *M. tuberculosis* encontrando un grupo de genes diferencialmente expresados en la cepa resistente, dentro de estos genes se encontraron sobre-expresados a *esxG* y *esxH* (Peñuelas-Urquides *et al*; 2013). Por lo tanto, el principal objetivo del presente consistió en estudio evaluar el efecto de la inhibición de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) en la resistencia a fármacos en *M. smegmatis*.

La inhibición mediante el RNA antisentido de la región codificante de los genes mostró una inhibición del 40% de los genes, sin embargo, otros autores han logrado generar una mayor inhibición de hasta el 66% en diversos genes tanto en *M. tuberculosis* como en *M. smegmatis* (Kang *et al.*, 2013; Chandolia *et al.*, 2014). Otros autores al seleccionar la secuencia antisentido solo se limitan a cierta región del gen o a regiones regulatorias, logrando mayor inhibición en las regiones regulatorias (Xu *et al.*, 2016), no obstante, otros autores también han logrado inhibir con la secuencia completa del marco abierto de lectura (ORF, open reading frame) (Rasmussen *et al.*, 2007; Cahndoli *et al.*, 2014; Darsonval *et al.*, 2015).

Por otro lado, se analizó si la inhibición de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) presentaba efectos en la resistencia a fármacos de primera línea en *M. smegmatis*. La CMI observada para isoniazida de la cepa pMV261  $\Delta$ *Msmeg\_0620-0621* presentó diferencias respecto a la cepa control utilizando el método de REMA, observando un incremento en la resistencia a este fármaco, a pesar de esperar una disminución en la

resistencia debido a lo reportado por nuestro grupo de investigación en donde en una cepa multifarmacoresistente los genes *esxG* y *esxH* de *M. tuberculosis* se encontraron sobreexpresados respecto a la cepa sensible a fármacos (Peñuelas-Urquides *et al*, 2013). Este resultado puede ser debido a que estos genes forman parte de un operón de 11 genes los cuales forman parte del sistema de secreción Esx-3, y al unirse el RNA antisentido puede estar inhibiendo de alguna forma a los otros genes del operón causando efectos polares como lo describen otros autores (Kole, Krainer & Altman, 2012). Además, dentro de estos 11 genes del operón Esx3 se localiza hacia el lado 3' de los genes inhibidos, el gen *eccD3*, el cual codifica para una proteína transmembranal, siendo el principal componente de la maquinaria de secreción de las moléculas del sistema Esx3. Recientemente una mutante de *M. smegmatis* sin el gen *eccD3* se reportó que presentó anormalidades en la formación y permeabilidad de la pared celular (Nath, Ray & Buragohain., 2018), por lo tanto, si el RNA antisentido utilizado en este estudio presenta efectos polares hacia este gen, el aumento de resistencia hacia isoniazida puede deberse a este efecto indirecto, debido a que afecte el ingreso del fármaco hacia la célula y por lo tanto no pueda ser activado (Timmins, 2006).

La CMI observada para rifampicina en la cepa pMV261  $\Delta$ *Msmeg\_0620-0621* concuerda con uno de los duplicados biológicos de la cepa control, y además concuerda con la CMI observada en la cepa silvestre de *M. smegmatis* (Agrawal, Miryala & Varshney, 2015; Arriaga-Guerrero, 2016). Para verificar esta inconsistencia en el duplicado biológico se ha sugerido realizar otra metodología mencionada, y así evaluar el efecto a pesar de la variabilidad que existe por naturaleza (Vaux, Fidle & Cumming, 2012).

En el caso del fármaco etambutol, no se observó efecto de la inhibición de los genes *esxG* y *esxH* respecto al crecimiento de la bacteria, sin embargo, la CMI observada de *M. smegmatis* en etambutol concuerda con la reportada en la literatura (Agrawal, Miryala & Varshney, 2015; Arriaga-Guerrero, 2016).

A partir de los resultados obtenidos con el REMA se seleccionaron tres concentraciones de rifampicina y de isoniazida para evaluar las cepas pMV261 y pMV261 *ΔMsmeg\_0620-0621* realizando cinéticas de crecimiento.

En el caso de rifampicina la CMI (1.6 µg/mL) se determinó analizando tanto el REMA tomando en cuenta que la literatura define que la CMI es la concentración más baja que inhibe entre el 80 y 90 % del crecimiento bacteriano (Andrews, 2001; EUCAST of ESCMID, 2003; Wiegand, Hilpert & Hancock, 2008). Por lo tanto, tanto en el REMA como en las curvas se observa una inhibición de aproximadamente del 80% en la concentración de 1.6 µg/mL.

En los resultados del REMA se observa que la cepa pMV261 *ΔMsmeg\_0620-0621* aumentó su resistencia a isoniazida observando crecimiento a 16 µg/mL, sin embargo, al realizar la curva de crecimiento desde las cero hasta las 27 h no se observa crecimiento bajo esta concentración de isoniazida, esta discrepancia, puede deberse a que en el REMA el crecimiento analiza hasta las 40 h lo que indica que la cepa se encuentra en fase estacionaria contrario a la curva en donde solo se logró observar hasta la fase exponencial (Gonzalez-y-Merchand *et al.*, 2012). De acuerdo con la literatura, en la fase estacionaria ocurren diferentes cambios bacterianos, entre ellos se encuentran: la disminución de la expresión de los sistemas involucrados en la captura del hierro, el aumento de la estabilidad del mRNA y el aumento a la resistencia a factores estresantes (Smeulders *et al.*, 1999; Rolfe *et al.*, 2011); por lo tanto, en la fase estacionaria es posible que el sistema Esx-3 disminuya su expresión por estar vinculado con la captura de hierro (Tinaztepe *et al.*, 2016), y el mRNA antisentido podría presentar mayor estabilidad, así que la combinación de estos dos factores puede ser la causa de una disminución del mRNA de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) en la fase estacionaria en comparación de la disminución observada en la fase exponencial (20 h), en donde probablemente dicha disminución no sea suficiente para visualizar un efecto en la resistencia a isoniazida como la observada a las 40 h en la fase estacionaria, por lo tanto, es necesario realizar otros estudios para comprobar la cantidad de mRNA presente a las 40 h del cultivo de las cepas.

Finalmente, dentro de las diferentes estrategias metodológicas reportadas en la literatura para inhibir la transcripción génica se encuentra CRISPRi, sin embargo, el proceso metodológico en nuestro laboratorio implicó mayor tiempo de lo esperado, por lo tanto, aunque la estrategia metodológica se estuvo estandarizando, aún se encuentra en proceso. Uno de los primeros pasos metodológicos es el diseño de los RNAg, el cual se realizó creando *primers* y tomando en consideración la región codificante y su unión a la hebra no molde, debido a que diversos autores mencionan que ocurre una mayor inhibición en esta región (Choudhary *et al.*, 2015; Rock *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2016; Xiao *et al.*, 2018). Sin embargo, el proceso de ligación del dsDNA (RNAg) generado por los *primers* de 22 pb ~ no se pudo clonar directamente en el vector PJLR962. En la literatura se ha reportado que fragmentos pequeños (>100 pb) son difíciles de ligar en un vector (Spanevello *et al.*, 2016; Sands & Brent, 2016), por lo tanto, se decidió cambiar la estrategia y generar un fragmento de 187 pb para ligar en el vector, aun así, no se logró la ligación de este fragmento. Cabe mencionar que para formar este fragmento es necesario ligar tres fragmentos de 87, 71 y 22 pb los cuales son pequeños, los resultados obtenidos se muestran en el anexo 1.

## 9. CONCLUSIÓN

- Se observó una inhibición del 40% de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) en *M. smegmatis* utilizando un RNA antisentido de la secuencia codificante de los genes.
- La inhibición de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) *M. smegmatis* le confirió una mayor resistencia en la cepa para isoniazida al evaluarlo por el REMA.
- Se observó una tendencia de mayor crecimiento de la cepa de *M. smegmatis* y pMV261  $\Delta$ *Msmeg\_0620-0621* durante la cinética de crecimiento en presencia de rifampicina.
- La inhibición de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) *M. smegmatis* no modificó el umbral de la CMI de etambutol.



## 10. PERSPECTIVAS

- Evaluar la cantidad de mRNA a las 40 h para comparar el nivel de inhibición de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) en *M. smegmatis*.
- Evaluar otros genes del sistema Esx3, los cuales puedan estar involucrados con la secreción de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) en *M. smegmatis*.
- Evaluar otras proteínas que son secretadas por el sistema Esx3, las cuales puedan tener un efecto directo con la resistencia a fármacos de primera línea y estén involucradas indirectamente con EsxG-EsxH.
- Comparar los métodos de inhibición del RNA antisentido con el de CRISPRi, y observar los resultados de ambos.

## 11. ANEXO 1. Inhibición de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*) en *M. smegmatis* utilizando el método de CRISPRi.

### 11.1 Anexo1. Metodología.

La inhibición de los genes *esxG* y *esxH* en *M. smegmatis*, se llevó a cabo por medio del sistema CRISPR-Cas9 de interferencia (CRISPRi-Cas9).

Primero se diseñaron los gRNA dirigidos hacia la región codificante de los genes *esxG* y *esxH* de *M. smegmatis* con numero de acceso MSMEG\_0620 y MSMEG\_0621 respectivamente; tomando en cuenta los sitios PAM descritos por Rock y colaboradores (Rock *et al*, 2017) (Tabla 1S).

Tabla 1S. Secuencias blanco, PAM y *primers* de los RNAg de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*).

| Gen  | RNAg     | Secuencia blanco del RNAg (5'—3')               | PAM (5'—3') | Posición |
|--|----------|---|-------------|----------|
| <i>esxG</i><br>( <i>Msmeg_0620</i> )                                   | esxG-1   | ACGCTCACATCCCCAGCTGAT                           | CG AGAAG    | + 14     |
|  | esxG-2   | GCCGCGCATGCCCCGTTTCGT                           | AG GGAAG    | +157     |
| <i>esxH</i><br>( <i>Msmeg_0621</i> )                                   | esxH-1   | CCGCGCGATGGCCACCACGCA                           | TA GGCAC    | +206     |
| <b>Primers utilizados para generar los RNAg</b>                        |          |   |             |          |
| RNAg-esxG-1  | Forward- | 5'- <u>GGGA</u> ATCA GCT GGG GGA TGT GAG CGT-3' |             |          |
|  | Reverse- | 5'- <u>AAAC</u> ACG CTC ACA TCC CCC AGC TGAT-3' |             |          |
| RNAg-esxG-2  | Forward- | 5'- <u>GGGA</u> ACGAAACGGGCATGCGCGGC-3'         |             |          |
|  | Reverse- | 5'- <u>AAAC</u> GCCGCGCATGCCCCGTTTCGT-3'        |             |          |
| RNAg-esxH-1  | Forward- | 5'- <u>GGGA</u> GCGTGGTGGCCATCGC GCGG -3'       |             |          |
|  | Reverse- | 5'- <u>AAAC</u> CCGC GCGATGGCCACCACGC-3'        |             |          |
| <u>Sitio subrayado</u> - secuencia que reconoce la enzima <i>BsmBI</i> |          |   |             |          |

Los RNAg's se clonaron en el vector del sistema CRISPRi (PLJR962 de 8881 pb), para su posterior transformación en *E. coli* DH5α, mediante choque térmico estandarizado por Sambrook & Russell (2001).

## 11. Anexo 1. Resultados.

El primer paso fue la selección de la secuencia de los RNA guías, los cuales fueron dos para el gen *esxG* (*Msmeg\_0620*) y uno para el gen *esxH* (*Msmeg\_0621*), en ambos genes el RNAg se seleccionó para que hibridara en la hebra no molde de la región codificante (Figura 1S). Se diseñaron *primers* específicos agregando la secuencia de reconocimiento de la enzima *BsmBI* para generar los RNA guías mediante su alineamiento y su posterior ligación en el vector PJLR962 (Tabla 1S).



**Figura 1S.** Esquema de los RNAg diseñados para los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*). NT- hebra no molde, T- hebra molde.

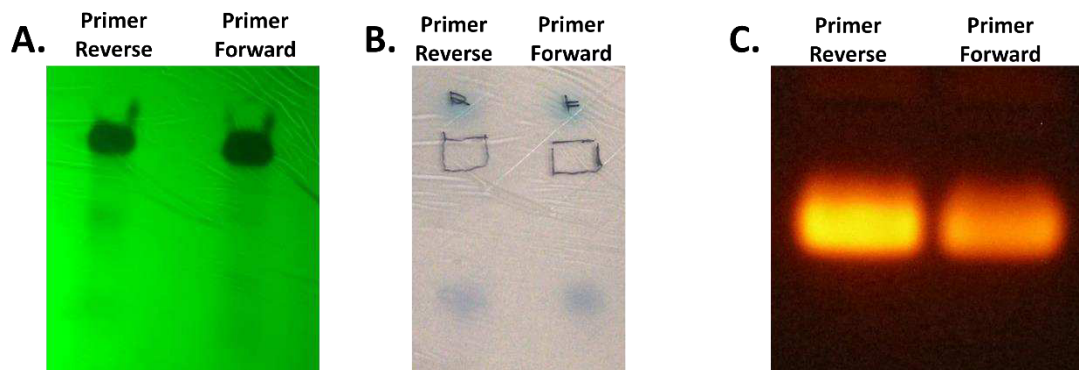
Tabla 1S. Secuencias blanco, PAM y *primers* de los RNAg de los genes *esxG* (*Msmeg\_0620*) y *esxH* (*Msmeg\_0621*).

| Gen   | RNAg     | Secuencia blanco del RNAg (5'—3')               | PAM (5'—3') | Posición |
|---|----------|---|-------------|----------|
| <i>esxG</i><br>( <i>Msmeg_0620</i> )            | esxG-1   | ACGCTCACATCCCCAGCTGAT                           | CG AGAAG    | + 14     |
|   | esxG-2   | GCCGCGCATGCCCCGTTTCGT                           | AG GGAAG    | +157     |
| <i>esxH</i><br>( <i>Msmeg_0621</i> )            | esxH-1   | CCGCGCGATGGCCACCACGCA                           | TA GGCAC    | +206     |
| <b>Primers utilizados para generar los RNAg</b> |          |   |             |          |
| RNAg-esxG-1                                     | Forward- | 5'- <u>GGGA</u> ATCA GCT GGG GGA TGT GAG CGT-3' |             |          |
|   | Reverse- | 5'- <u>AAAC</u> ACG CTC ACA TCC CCC AGC TGAT-3' |             |          |
| RNAg-esxG-2                                     | Forward- | 5'- <u>GGGA</u> ACGAAACGGGCATGCGCGGC-3'         |             |          |
|   | Reverse- | 5'- <u>AAAC</u> GCCGCGCATGCCCCGTTTCGT-3'        |             |          |

Forward- 5'-GGGA GCGTGGTGGCCATCGC GCGG -3'  
 RNAg-esxH-1 Reverse- 5'-AAAC CCGC GCGATGGCCACCACGC-3'

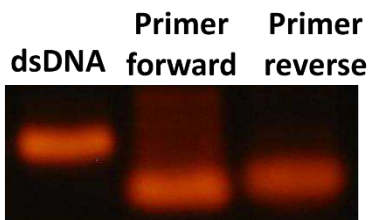
Sitio subrayado- secuencia que reconoce la enzima *BsmBI*

Los primers fueron purificados utilizando una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con urea, observando su concentración mediante la visualización de su sombra colocando el gel en una placa TLC fluorescente iluminada con una lámpara UV (Figura 2S.A), marcando la región mencionada (Figura 2S.B) y su posterior purificación mediante precipitación etanólica confirmando su calidad y concentración obtenida mediante el corrimiento de una electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Figura 2S.C).



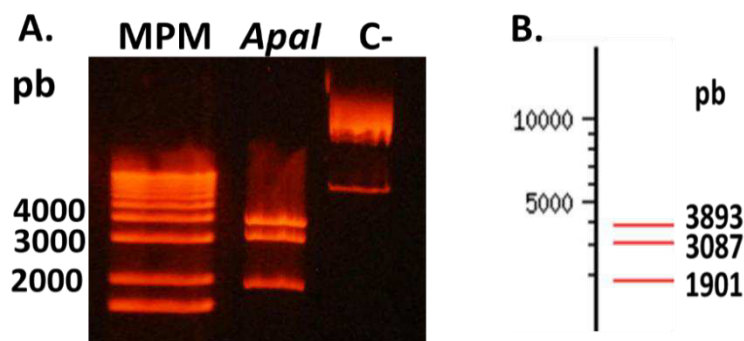
**Figura 2S. Purificación de los *primers* para generar los RNAg mediante PAGE con urea.** A. Visualización de la concentración de los *primers* observando su sombra utilizando una placa TLC fluorescente iluminada con luz UV. B. Gel de poliacrilamida señalando la posición de los *primers* en un rectángulo. C. Imagen del gel de agarosa al 1% para visualizar la integridad y calidad de los *primers* purificados. Imágenes correspondientes a los *primers* para generar el RNAg- esxG2.

La formación del dsDNA generado a partir de los *primers* purificados para cada RNAg se confirmó observándose en un corrimiento electroforético en donde presenta una menor migración en comparación de los *primers* (ssDNA) (Figura 3S).



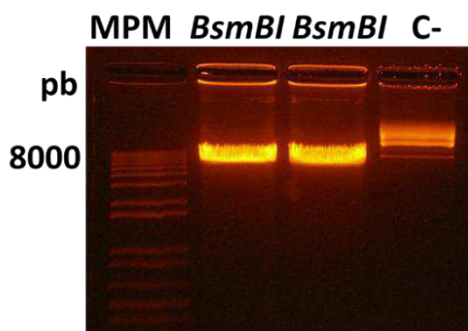
**Figura 3S. Formación del RNAg (dsDNA). dsDNA- generado a partir del alineamiento de los *primers*. Primer forward y Primer Reverse. Gel de agarosa al 4%. La imagen es representativa del RNAg-esxG-2.**

La caracterización del vector PJLR962 se llevó a cabo primeramente de manera *in silico* utilizando el software Nebcutter, para la posterior realización del ensayo con la enzima seleccionada, *ApaI*. La visualización de los fragmentos generados en la digestión enzimática con *ApaI* se realizó mediante un corrimiento electroforético en donde se observan los fragmentos esperados de 3893, 3087 y 1901 pb (Figura 4S).



**Figura 4S. Caracterización del vector PJLR962 con la enzima de restricción *ApaI*.** A. Se observan los fragmentos de 3893, 3087 y 1901 pb, en un gel de agarosa al 1%. MPM-marcador de peso molecular 1kpb DNA plus (Invitrogen). *ApaI*- digestión del vector PJLR962. C- control negativo, vector sin enzima. B. Ensayo de restricción *in silico*.

Una vez caracterizado el vector PJLR962 se siguió con la linealización y desfosforilación utilizando la enzima de restricción *BsmBI* (Figura 5S) con el objetivo de realizar la ligación del dsRNA generado anteriormente, para su posterior transformación en bacterias *E. coli DH5α*; sin embargo, no se obtuvieron colonias de dicha transformación, por lo tanto, no se logró realizar la ligación del vector con el RNAg.



**Figura 5S. Linealización del vector PJLR962 con la enzima *BsmBI* y desfosforilación.** MPM- marcador de peso molecular 1kpb DNA plus (Invitrogen). *BsmBI*- vector digerido. C-, vector sin digerir/sin enzima. En un gel de agarosa al 1%.

Para obtener las construcciones del RNAg de cada gen se utilizó otra estrategia para su clonación, esta se basa en realizar dos ensayos con enzimas de restricción, el primer ensayo genera dos fragmentos, uno flanqueando el sitio de *BsmBI* y linealiza el vector; y el segundo ensayo genera tres fragmentos, de los cuales dos son los que se seleccionan debido a que cuentan con el sitio de *BsmBI* en un extremo, posteriormente se purifican y continua la ligación de estos dos fragmentos con el dsDNA generado por los *primers* (RNAg de cada gen) y finalmente una segunda ligación de este fragmento con el vector (Figura 6S). Se observó un fragmento de aproximadamente 183 pb y otro de 8698pb en la digestión del vector PJLR962 con las enzimas *EcoRI* y *Sall*, realizando un duplicado de la digestión; en la segunda digestión con la enzima *BsmBI* se observan los fragmentos de 87, 71 y 8698 pb aproximadamente, pero en uno de los duplicados se observó un cuarto fragmento de aproximadamente 110 pb (Figura 7S) correspondiente a los fragmentos 87 y 71 pb. Los fragmentos de 87, 71 y 8698 pb visualizados mediante el corrimiento de un gel de poliacrilamida al 20%, fueron purificados para su posterior ligación. Las construcciones obtenidas fueron transformadas en *E. coli DH5a*, pero no se obtuvo ningún candidato con la clonación del RNAg, verificándolo por secuenciación.

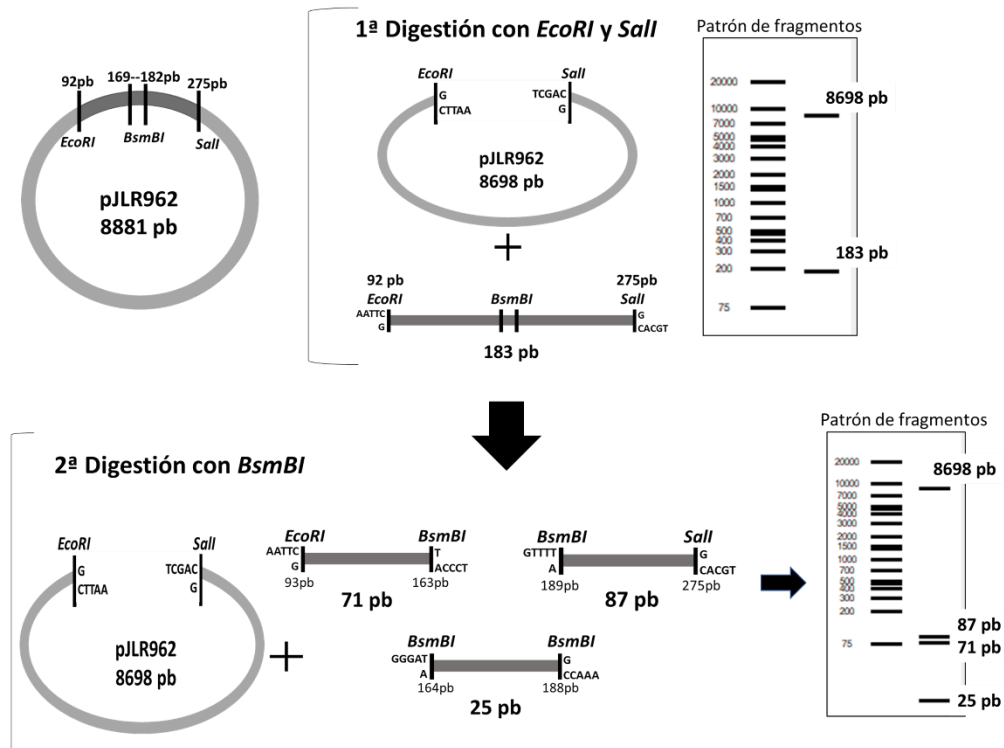


Figura 6S. Estrategia para realizar la clonación del RNAg realizando dos ensayos con enzimas de restricción. Gel del patrón esperado de los fragmentos en cada una de las dos reacciones de digestión.

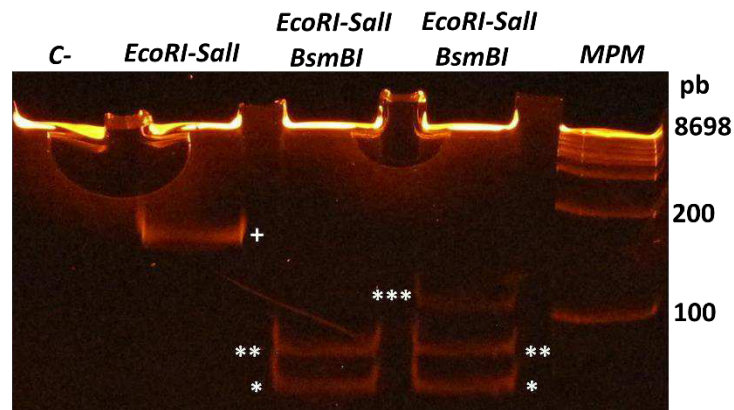


Figura 7S. Liberación de los fragmentos del vector PJLR962 mediante enzimas de restricción. MPM- marcador de peso molecular 1kpb DNA plus (Invitrogen), *EcoRI-Sall*- se observan los fragmentos de 8698 y 183 pb (+), *EcoRI-Sall-BsmBI*- se observan los fragmentos de 8698, 87 (\*\*) y 71 pb (\*), y en un duplicado se observa un fragmento de 110 pb (\*\*\*), C-, ensayo sin enzima de restricción, solo el vector PJLR962. Gel de poliacrilamida al 20%.

## 11. BIBLIOGRAFIA

Organización Mundial de la Salud. 2013a. Definitions and reporting framework for tuberculosis–2013 revision 2014.

Organización Mundial de la Salud. 2013b. Tuberculosis. Saudi Medical Journal, 34(11), 1205-1207.

Organización Mundial de la Salud. 2018. Global tuberculosis report 2018. World Health Organization. 2018.

CENAPRECE. MACRO TB-MDFR, PNT, DAPP. Datos y retos en Tuberculosis fármacorresistente en México. 2017. <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/TBMDRMexicoal2014.pdf>

SINAVE. 2013. SINAVE, DGE: Anuarios de morbilidad, Cierre 2013. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/35966/TByDSSMexicoCursoTB2014.pdf>

Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-2013, Para la prevención y control de la tuberculosis. Diario Oficial de la Federación. 13 de septiembre de 2012.

Abdallah A, van Pittius NCG, Champion PAD, Cox J, Luirink J, Vandenbroucke-Grauls C, & Bitter W. 2007. f. *Nature reviews microbiology*. 5(11), 883-891. <http://doi:10.1038/nrmicro1773>.

Agrawal P, Miryala S, Varshney U. 2015. Use of *Mycobacterium smegmatis* deficient in ADP-ribosyltransferase as surrogate for *Mycobacterium tuberculosis* in drug testing and mutation analysis. Plos One 10: 1-13.



Almeida P & Palomino J. 2011. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother*; 66 (7): 1417-1430. doi: 10.1093/jac/dkr173

Altamirano M, Miller CH, Bellows DS, & O'Toole R. 2010. Evaluation of the *Mycobacterium smegmatis* and BCG models for the discovery of *Mycobacterium tuberculosis* inhibitors. *Tuberculosis*, 90(6), 333-337. DOI: 10.1016/j.tube.2010.09.002

Arriaga-Guerreo A. (2016). Efecto de la expresión de lipF en la condición de farmacorresistencia de una cepa modelo de *Mycobacterium tuberculosis*. (Tesis de Maestría), Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León.

Brennan PJ, & Crick DC. (2007). The cell-wall core of *Mycobacterium tuberculosis* in the context of drug discovery. *Current topics in medicinal chemistry*, 7(5), 475-488. <https://doi.org/10.2174/15680260778005976>

Brodin P, Rosenkrands I, Andersen P, Cole ST, & Brosch R. 2004. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors?. *Trends in microbiology*, 12(11), 500-508. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2004.09.007>

Brown-Elliott BA, & Wallace RJ. 2002. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clinical microbiology reviews*, 15(4), 716-746.

Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Harris R, Ignatyeva O, Kontsevaya I, & Horstmann R. 2014. Evolution and transmission of drug resistant tuberculosis in a Russian population. *Nature genetics*, 46(3), 279-286. DOI: <http://doi:10.1038/ng.2878>

Coyne KM, Pozniak AL, Lamorde M & Boffito M. 2009. Pharmacology of second-line antituberculosis drugs and potential for interactions with antiretroviral agents. *Aids*, 23(4), 437-446.

Du P, Sohaskey CD & Shi L. 2016. Transcriptional and Physiological Changes during Mycobacterium tuberculosis Reactivation from Non-replicating Persistence. *Frontiers in microbiology*, 1346 (7): 1-15. doi: 10.3389/fmicb.2016.01346

Dumas E, Boritsch E, Vandenbogaert M, de La Vega R, Thiberge J, Caro V, & Sapriel G. 2016. Mycobacterial pan-genome analysis suggests important role of plasmids in the radiation of type VII secretion systems. *Genome biology and evolution*, 8(2), 387-402. doi: 10.1093/gbe/evw001

Etienne G, Laval F, Villeneuve C, Dinadayala P, Abouwarda A, Zerbib D, & Daffe M. 2005. The cell envelope structure and properties of Mycobacterium smegmatis mc2155: is there a clue for the unique transformability of the strain?. *Microbiology*, 151(6), 2075-2086.

Falzon D, Schünemann HJ, Harausz E, González-Angulo L, Lienhardt C, Jaramillo E & Weyer K. 2017. World Health Organization treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis, 2016 update. *European Respiratory Journal*, 49(3), 1602308.

Fenton MJ, & Vermeulen MW. 1996. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infection and immunity*, 64(3), 683. <http://iai.asm.org/content/64/3/683.full.pdf>

Gey Van Pittius NC, Gamiieldien J, Hide W, Brown GD, Siezen RJ & Beyers AD. 2001. The ESAT-6 gene cluster of Mycobacterium tuberculosis and other high G+C Gram-positive bacteria. *Genome Biology*. 2(10):0044. DOI: 10.1186/gb-2001-2-10-research0044

González-Escalante L, Peñuelas-Urquides K, Said-Fernández S, Silva-Ramírez B & Bermúdez de León M. 2015. Differential expression of putative drug resistance genes in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. *FEMS Microbiol Lett* ; 362 (23): fnv194. doi: 10.1093/femsle/fnv194

Gonzales-y-Merchand JA, Zaragoza-Contreras R, Guadarrama-Medina R, Helguera-Repetto AC, Rivera-Gutierrez S, Cerna-Cortes JF, Santos-Argumedo L, Cox RA. 2012. Evaluation of the cell growth of micobacteria using *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 as a representative species. *The journal of microbiology* 50: 419-425.

Granados-Tristán A. (2017). Análisis comparativo de secuencias de los genes *esxG* y *esxH* potencialmente involucrados en farmacorresistencia de una cepa sensible y una multifarmacorresistente de *Mycobacterium tuberculosis*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León.

Gygli SM, Borrell S, Trauner A & Gagneux S. 2017. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: mechanistic and evolutionary perspectives. *FEMS microbiology reviews*, 41(3), 354-373. DOI:<https://doi.org/10.1093/femsre/fux011>

He L, Fan X & Xie J. 2012. Comparative genomic structures of *Mycobacterium* CRISPR-Cas. *Journal of cellular biochemistry*, 113(7), 2464-2473.

Hervas-Stubbs S, Majlessi L, Simsova M, Morova J, Rojas MJ, Nouzé C, & Leclerc C. 2006. High frequency of CD4+ T cells specific for the TB10. 4 protein correlates with protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infection and immunity*, 74(6), 3396-3407. doi: 10.1128/IAI.02086-05

Hoffmann C, Leis A, Niederweis M, Plitzko M, & Engelhardt H. (2008). Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(10), 3963-3967. doi: 10.1073/pnas.0709530105

Houben EN, Korotkov KV, & Bitter W. 2014. Take five—Type VII secretion systems of *Mycobacteria*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(8), 1707-1716. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.11.003>

Hsu PD, Lander ES. & Zhang F. 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262-1278. DOI: 10.1002/jcb.24121

Jagielski T, Minias A, Van Ingen J, Rastogi N, Brzostek A, Żaczek A, & Dziadek J. 2016. Methodological and clinical aspects of the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. *Clinical microbiology reviews*, 29(2), 239-290. doi: 10.1128/CMR.00055-15

Kamholz SL. 2002. Drug resistant tuberculosis. *Journal of the Association for Academic Minority Physicians: the official publication of the Association for Academic Minority Physicians*, 13(2), 53-56.

Landick R, Krek A, Glickman MS, Socci ND, & Stallings CL. 2014. Genome-wide mapping of the distribution of CarD, RNAP  $\sigma$  A, and RNAP  $\beta$  on the *Mycobacterium smegmatis* chromosome using chromatin immunoprecipitation sequencing. *Genomics data*, 2, 110-113.

Maciąg A, Dainese E, Rodriguez G, Milano A, Provvedi R, Pasca M, & Manganelli R. 2007. Global analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Zur (FurB) regulon. *Journal of bacteriology*, 189(3), 730-740. doi: 10.1128/JB.01190-06

Machado D, Couto I, Perdigão J, Rodrigues L, Portugal I, Baptista P, & Viveiros M. 2012. Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PloSone*, 7(4), e34538, DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0034538>

Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, & Van Der Oost J. 2011. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6), 467-477.

Mehra A, Zahra A, Thompson V, Sirisaengtaksin N, Wells A, Porto M, & Rogan D. 2013. Mycobacterium tuberculosis type VII secreted effector EsxH targets host ESCRT to impair trafficking. *PLoS Pathog*, 9(10), e1003734, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003734>

Mi Y, Bao L, Gu D, Luo T, Sun C, & Yang G. 2017. Mycobacterium tuberculosis PPE25 and PPE26 proteins expressed in Mycobacterium smegmatis modulate cytokine secretion in mouse macrophages and enhance mycobacterial survival. *Research in microbiology*, 168(3), 234-243.

Mohanraju P, Makarova KS, Zetsche B, Zhang F, Koonin EV & van der Oost J. 2016. Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science*, 353(6299), aad5147.

Mojica FJ & Montoliu L. 2016. On the origin of CRISPR-Cas technology: from prokaryotes to mammals. *Trends in microbiology*, 24(10), 811-820. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.005>

Morris S, Han Bai G, Suffys P, Portillo-Gomez L, Fairchok M & Rouse D. 1995. Molecular Mechanisms of Multiple Drug Resistance in Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis*; 171 (4): 954-960. doi: 10.1093/infdis/171.4.954

Mullie G, Schwartzman K, Zwerling A, & N'Diaye DS. 2017. Revisiting annual screening for latent tuberculosis infection in healthcare workers: a cost-effectiveness analysis. *BMC medicine*, 15(1), 104. doi: 10.1186/s12916-017-0865-x

Nahid P, Dorman SE, Alipanah N, Barry PM, Brozek JL, Cattamanchi A, ... & Higashi JM. 2016. Official American Thoracic Society/centers for disease control and prevention/infectious diseases society of America clinical practice guidelines: treatment of drug-susceptible tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*, 63(7), e147-e195. doi: 10.1093/cid/ciw376

Nakashima N & Miyazaki K. 2014. Bacterial cellular engineering by genome editing and gene silencing. *International journal of molecular sciences*, 15(2), 2773-2793.

Nguyen L. 2016. Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: an update. *Archives of toxicology*, 90(7), 1585-1604.

Pandey R, Russo R, Ghanny S, Huang X, Helmann J, & Rodriguez M. 2015. MntR (Rv2788): a transcriptional regulator that controls manganese homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular microbiology*, 98(6), 1168-1183. DOI: 10.1111/mmi.13207

Peto HM, Pratt R, Harrington T, LoBue PA, & Armstrong LR. 2009. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in the United States, 1993–2006. *Clinical Infectious Diseases*, 49(9), 1350-1357. DOI: <https://doi.org/10.1086/605559>

Peñuelas-Urquides K, Gonzalez-Escalante L, Villarreal-Trevino L, Silva-Ramirez B, Gutierrez-Fuentes J, Mojica-Espinosa R, & Castorena-Torres F. 2013. Comparison of gene expression profiles between pansensitive and multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Current microbiology*, 67(3), 362-371. doi:10.1007/s00284-013-0376-8

Raamsdonk LM, Teusink B, Broadhurst D, Zhang N, Hayes A, Walsh MC & Westerhoff, HV. 2001. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nature biotechnology*, 19(1), 45-50.

Rock JM, Hopkins FF, Chavez A, Diallo M, Chase MR, Gerrick ER, Pritchard J, Church G, Rubin E, Sassetti C, Schnappinger D, & Fortune S. 2017. Programmable transcriptional repression in mycobacteria using an orthogonal CRISPR interference platform. *Nature Microbiology*, 2, 16274.

Rodriguez G M, Voskuil M I, Gold B, Schoolnik G K, & Smith I. 2002. ideR, an essential gene in *Mycobacterium tuberculosis*: role of IdeR in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response. *Infection and immunity*, 70(7), 3371-3381. doi: 10.1128/IAI.70.7.3371-3381.2002

Sander JD & Joung JK. 2014. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature biotechnology*, 32(4), 347-355.

Singh AK, Carette X, Potluri LP, Sharp JD, Xu R, Pristic S, & Husson RN. 2016. Investigating essential gene function in *Mycobacterium tuberculosis* using an efficient CRISPR interference system. *Nucleic acids research*, 44(18), e143-e143.

Serafini A, Boldrin F, Palù G, & Manganelli R. 2009. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* ESX-3 conditional mutant: essentiality and rescue by iron and zinc. *Journal of bacteriology*, 191(20), 6340-6344. doi:10.1128/JB.00756-09

Shinnick T M, & Good R C. 1994. Mycobacterial taxonomy. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13(11), 884-901. DOI:10.1007/BF02111489 52

Skjøl R, Brock I, Arend SM, Munk ME, Theisen M, Ottenhoff TH, & Andersen P. 2002. Epitope mapping of the immunodominant antigen TB10. 4 and the two homologous proteins TB10. 3 and TB12. 9, which constitute a subfamily of the esat-6 gene family. *Infection and immunity*, 70(10), 5446-5453. DOI: 10.1128/IAI.70.10.5446-5453.2002

Snapper S, Melton RE, Mustafa S, Kieser T, & WR J. 1990. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular microbiology*, 4(11), 1911-1919.

Somoskovi A, Parsons LM, & Salfinger M. 2001. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respiratory research*, 2(3), 164. DOI: 10.1186/rr54

Stinear T, Seemann T, Harrison F, Jenkin A, Davies K, Johnson P, & Clarke K. 2008. Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome research*, 18(5), 729-741. doi:10.1101/gr.075069.107

Sweeney K, Dao D, Goldberg M, Hsu T, Venkataswamy M, Henao-Tamayo M, & Chen M. 2011. A recombinant *Mycobacterium smegmatis* induces potent bactericidal immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature medicine*, 17(10), 1261-1268. doi: 10.1038/nm.2420

Tycko J, Myer VE & Hsu PD. 2016. Methods for optimizing CRISPR-Cas9 genome editing specificity. *Molecular cell*, 63(3), 355-370.

Udwadia Z, Amale R, Ajbani K, & Rodrigues C. 2012. Totally drug-resistant tuberculosis in India. *Clinical Infectious Diseases*, 54(4), 579-581. DOI: <http://cid.oxfordjournals.org/content/54/4/579.full.pdf>

Victor TC, Van Helden, P. D., & Warren, R. 2002. Prediction of drug resistance in *M. tuberculosis*: molecular mechanisms, tools, and applications. *IUBMB life*, 53(4-5), 231-237.

Wang Y, Zhang ZT, Seo SO, Lynn P, Lu T, Jin YS & Blaschek HP. 2016. Bacterial genome editing with CRISPR-Cas9: deletion, Integration, single nucleotide modification, and desirable “clean” mutant selection in *Clostridium beijerinckii* as an example. *ACS synthetic biology*, 5(7), 721-732. DOI: 10.1021/acssynbio.6b00060



Yamchi J, Haeili M, Feyisa S, Kazemian H, Shahraki A H, Zahednamazi F, & Feizabadi M. 2015. Evaluation of efflux pump gene expression among drug susceptible and drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* from Iran. *Infection, Genetics and Evolution*, 36, 23-26. DOI: 10.1016/j.meegid.2015.08.036

Yu G, Cui Z, Sun X, Peng J, Jiang J, Wu W, & Li Y. 2015. Gene expression analysis of two extensively drug-resistant tuberculosis isolates show that two-component response systems enhance drug resistance. *Tuberculosis*, 95(3), 303-314. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2015.03.008>

Zala HN, Bosamia TC, Shukla YM, Kumar S & Kulkarni KS. 2016. Genome modifications in crops employing engineered nucleases. *Agric Rev*, 37, 154-

## RESUMEN BIOGRÁFICO

Ana Laura Granados Tristán

Candidato para el grado de  
Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LOS GENES *esxG* y *esxH* EN  
LA RESISTENCIA A FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA EN  
*Mycobacterium smegmatis* COMO MODELO DE *M. tuberculosis*

Campo de estudio: Microbiología

Datos personales: Nacida en la Ciudad de México el 15 de diciembre, hija de  
Fernando Granados Maciel y Laura Tristán Cárdenas.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido  
de Licenciatura en Biotecnología Genómica.